



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Evaluación de una técnica de PCR múltiple para la detección rápida de *Salmonella typhimurium* y/o enteritidis en cobayos naturalmente infectados

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Gerardo Ramon DÍAZ ORTIZ

ASESOR

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Díaz G. Evaluación de una técnica de PCR múltiple para la detección rápida de *Salmonella typhimurium* y/o enteritidis en cobayos naturalmente infectados [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2016.



3
2-11(12)
61
**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **miércoles 17 de agosto de 2016**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 104-EAPMV/FMV-2016, integrado por los siguientes profesores:

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Presidente del Jurado
ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ	Asesor de la Tesis
RONALD JIMÉNEZ ALIAGA	Miembro del Jurado
SIEVER MORALES CAUTI	Miembro del Jurado

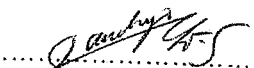
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **DÍAZ ORTIZ, GERARDO RAMÓN**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

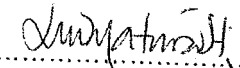
**"EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA
DE Salmonella TYPHIMURIUM Y/O ENTERITIDIS EN COBAYOS NATURALMENTE
INFECTADOS"**

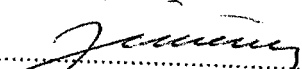
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.


Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal D.E.


Abelardo Maturrano Hernández: Dr. Prof. Asociado, T.C.


Ronald Jiménez Aliaga: Mg. Prof. Asociado, D.E.


Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T.P.





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

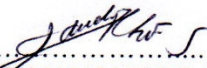
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

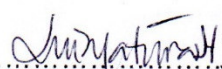
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 104-EAPMV/FMV-2016

PRESIDENTE :


ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

MIEMBROS :


ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ
Asesor de la Tesis


RONALD JIMÉNEZ ALIAGA


SIEVER MORALES CAUTI

San Borja, 17 de agosto de 2016

Vº Bº

.....
DRA. DAPHNE RAMOS DELGADO
Directora de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria



*A las mujeres de mi vida,
sí, a usted también.*

AGRADECIMIENTOS

Debo comenzar por agradecer a mis mentores, el Dr. Raúl Rosadio Alcántara y el Dr. Lenin Maturrano Hernández, líderes de la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, quienes me abrieron las puertas a un estupendo grupo de investigación y me dieron la oportunidad de embarcarme en esta gran aventura de descubrir la vida día a día a través de la ciencia; gracias a su empeño e inacabable dedicación logran y seguirán logrando inspirar nuevas generaciones de investigadores en las especies oriundas de nuestro Perú.

Seguidamente agradecer también a todo el maravilloso grupo humano que conforma el laboratorio, a todos y cada uno de ustedes que pusieron su roca de arena en la realización de esta tesis; a Rocío Rímac, por su eficaz coordinación en la toma de muestras y su paciencia para ser una constante guía en el procesamiento de estas, a Juan José Siuce, por su aporte en ideas y buenos debates para enfocar correctamente esta tesis, a Jorge Maximiliano, Marcos Almeyda y Raquel Hurtado, por poner el hombro siempre que fue necesario; y en especial a Anita Chero, Geraldine Marcelo y el resto de chicas que alguna vez se vieron inevitablemente involucradas en este proyecto, gracias por su inmensa ayuda en las largas horas de necropsias, aislamientos bacterianos, pruebas bioquímicas y demás quehaceres en el laboratorio, que sin ustedes no hubiese podido terminar hasta el día de hoy.

Debo agradecer también a quienes muy amablemente nos dieron todas las facilidades para la toma de muestras de este proyecto, a la Unidad de Cuyes de la Estación Experimental “El Mantaro” del Instituto Veterinario de Investigaciones de Trópico y Altura de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Jauja, Junín) a través de su director el Mg. Ronald Jiménez Aliaga; también a la Asociación de criadores de cuyes “Pachacuy” (Chancay, Lima) a través de su asesor, el M.V. Iván Reyna Watanabe, quien nos brindó su tiempo de manera esmerada y desinteresada, convirtiéndose en un aliado crucial para la realización de este proyecto; en general, gracias a todos los productores que a diario sacan adelante la crianza de nuestros cuyes en el Perú, por ellos es que cobran sentido todas las horas en el laboratorio.

Finalmente resaltar que esta tesis se pudo realizar gracias al financiamiento del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innóvate Perú) de acuerdo al contrato N° 362-PNICP-PIAP-2014, del proyecto de investigación “Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de salmonelosis en la producción de cuyes”, llevado a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



INDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
1. La producción de cuyes en el Perú.....	3
1.1. Situación actual.....	3
1.2. Importancia.....	4
1.3. Problemática.....	6
2. La salmonelosis en el cuy.....	7
2.1. Generalidades.....	7
2.1.1. Agente etiológico.....	7
2.1.2. Taxonomía y nomenclatura.....	7
2.2. Epidemiología.....	8
2.3. Transmisión y patogenie.....	9
2.3.1. Transmisión.....	9
2.3.2. Patogenie.....	10
2.3.2.1. Biología celular de la infección de <i>Salmonella</i>	11
2.3.2.2. Evasión de la respuesta inmune del hospedero.....	12
2.3.2.3. Sobrevivencia en el hospedero.....	12
2.4. Signos clínicos y lesiones.....	13
2.4.1. Signos clínicos.....	13
2.4.2. Lesiones.....	14
2.5. Toma de muestras para el diagnóstico.....	14

2.6. Tratamiento.....	15
2.7. Prevención y control.....	15
3. Detección microbiológica convencional de <i>Salmonella</i> spp.....	16
3.1. Pre-enriquecimiento no selectivo.....	16
3.2. Enriquecimiento selectivo.....	17
3.3. Aislamiento en agar selectivo y diferencial.....	17
3.3.1. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).....	18
3.4. Identificación de <i>Salmonella</i> spp. mediante pruebas bioquímicas.....	19
3.4.1. Agar Hierro Triple Azúcar (TSI).....	20
3.4.2. Agar Lisina Hierro (LIA).....	22
3.4.3. Agar Sulfito Indol Motilidad (SIM).....	23
3.4.4. Agar Citrato de Simmons.....	24
3.4.5. Agar Urea.....	25
3.5. Identificación de <i>Salmonella</i> spp. mediante serotipificación.....	25
3.5.1. Antígeno somático (O).....	26
3.5.2. Antígeno flagelar (H).....	26
3.5.3. Antígeno capsular (Vi).....	27
3.5.4. Esquema de Kauffmann – White.....	27
4. Detección molecular de <i>Salmonella</i> spp.....	28
4.1. Componentes de la PCR.....	29
4.1.1. ADN Polimerasa.....	29
4.1.2. Oligonucleótidos cebadores.....	29
4.1.3. dNTP.....	29
4.1.4. Cationes divalentes.....	29
4.1.5. Buffer.....	30
4.1.6. ADN molde.....	30
4.2. Etapas de la PCR.....	30
4.2.1. Desnaturalización.....	30
4.2.2. Hibridación.....	30
4.2.3. Elongación.....	31
4.3. La PCR múltiple.....	31
4.4. Protocolos para la detección de <i>Salmonella</i> spp. mediante PCR.....	31
5. Otros métodos de detección de <i>Salmonella</i> spp.....	32

5.1. Métodos rápidos.....	32
5.2. Método de fagotipificación.....	33
5.3. Métodos genotípicos.....	33
5.4. Métodos inmunológicos.....	34
6. Desempeño de la PCR respecto a otros métodos de detección de <i>Salmonella</i> spp.....	35
III. MATERIALES Y METODOS.....	37
1. Lugar y Tiempo.....	37
2. Material y Diseño experimental.....	37
3. Metodología.....	38
3.1. Toma de muestras.....	39
3.2. Procesamiento de muestras.....	39
3.2.1. Análisis microbiológico.....	42
3.2.1.1. Pre-enriquecimiento no selectivo.....	42
3.2.1.2. Enriquecimiento selectivo.....	40
3.2.1.3. Aislamiento en agar selectivo y diferencial.....	40
3.2.1.4. Caracterización bioquímica.....	40
3.2.2. Análisis molecular.....	40
3.2.2.1. Extracción de ADN.....	41
3.2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
3.2.2.3. Electroforesis.....	42
3.2.2.4. Visualización de bandas.....	42
4. Análisis de datos.....	43
IV. RESULTADOS.....	45
V. DISCUSION.....	47
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. RECOMENDACIONES.....	53
VIII. LITERATURA CITADA.....	54

RESUMEN

La detección rápida de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis como agentes causales de la Salmonelosis en cobayos es importante para la toma de decisiones que ayude a disminuir el impacto económico negativo en un brote de esta enfermedad, por ello el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de detección de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis mediante el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Múltiple a partir de muestras en pre-enriquecimiento no selectivo, (utilizando secuencias blanco de los genes *InvA*, *fliC* y *prot6E*) y hallar la concordancia entre ésta y el método de detección microbiológica convencional que consta de pre-enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, aislamiento en agar diferencial y pruebas bioquímicas. Se analizaron simultáneamente mediante ambos métodos un total de 111 muestras de hígado de cobayos con diagnóstico presuntivo de Salmonelosis provenientes de Chancay (Lima) y El Mantaro (Junín), llegando a detectar *Salmonella* Typhimurium por PCR Múltiple en 54% (60/111) de muestras y por análisis microbiológico en 41% (45/111) de ellas. Las pruebas mostraron una concordancia substancial con un valor de Kappa de 0.64 y la prueba de McNemar demostró que los resultados de ambas pruebas son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$), por lo tanto se concluye que la PCR Múltiple a partir de muestras en pre-enriquecimiento no selectivo sirve como una prueba tamiz que detecta *Salmonella* Typhimurium en volúmenes grandes de muestras de hígado de cobayos, siendo esta menos laboriosa y más rápida que la detección microbiológica convencional, sin embargo se recomienda utilizar ambas técnicas en combinación para mejorar los resultados.

Palabras clave: PCR múltiple, detección rápida, análisis microbiológico, *Salmonella*, Cobayo.

ABSTRACT

Rapid detection of *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis as etiologic agents of Salmonellosis in guinea pigs is important for decision-making that helps to decrease the negative economic impact in a disease outbreak, for this reason the aim of this study was to evaluate the detection ability of *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis by the Multiplex Polimerase Chain Reaction (PCR) method from non-selective pre-enrichment samples (using target sequences of *InvA*, *fliC* and *prot6E* genes) and find the concordance between this and the conventional microbiological isolation method consisting of non-selective pre-enrichment, selective enrichment, isolation on differential agar and biochemical tests. A total of 111 liver samples of guinea pigs with presumptive Salmonellosis diagnosis, from Chancay (Lima) and El Mantaro (Junín), were simultaneously analyzed using both methods and *Salmonella* Typhimurium was detected by Multiplex PCR in 54% (60/111) of samples and by Microbiological Isolation in 41% (45/111) of them. The concordance between the methods was substantial with a Kappa value of 0.64 and the McNemar test showed that the results of both methods are statistically different ($p>0.05$), therefore the conclusion is that the Multiplex PCR method from non-selective pre-enrichment samples works as a screening test that detects *Salmonella* Typhimurium in big amount of guinea pigs' liver samples, which is practical and faster than the conventional microbiological isolation, however we recommend to use both methods combined in order to enhance the results.

Keywords: Multiplex PCR, rapid detection, microbiological isolation, *Salmonella*, cobayo

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Nueva nomenclatura para subespecies de <i>Salmonella entérica</i>	8
Cuadro 2. Características de las colonias de <i>Salmonella</i> spp. en medios selectivos y diferenciales	18
Cuadro 3. Aspecto de colonias en agar XLD	19
Cuadro 4. Pruebas bioquímicas de <i>Salmonella entérica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	20
Cuadro 5. Crecimiento de enterobacterias en TSI	21
Cuadro 6. Crecimiento de enterobacterias en LIA	23
Cuadro 7. Crecimiento de enterobacterias en agar SIM	24
Cuadro 8. Perfil bioquímico para detectar <i>Salmonella</i> spp.	40
Cuadro 9. Cebadores utilizados en la PCR Múltiple	41
Cuadro 10. Reactivos para la mezcla de la PCR Múltiple	41
Cuadro 11. Condiciones para la PCR Múltiple	42
Cuadro 12. Interpretación de resultados de la PCR Múltiple para <i>Salmonella</i> spp.	43
Cuadro 13. Tabla de contingencia	43
Cuadro 14. Grados de concordancia para Kappa	44
Cuadro 15. Resultados de detección de <i>Salmonella</i> mediante Análisis Microbiológico y PCR múltiple distribuidos en tabla de contingencia 2 x 2	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Rol de las células M en la infección por <i>Salmonella</i>	11
Figura 2.	Diagrama de flujo del procesamiento de muestras para detección de <i>Salmonella</i> spp. mediante análisis microbiológico y análisis molecular	39
Figura 3.	Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de la PCR Múltiple para <i>Salmonella</i> Typhimurium y Enteritidis	46

I. INTRODUCCION

El cuy (*Cavia porcellus*) es una especie nativa de los andes sudamericanos que cuenta con una población de 12 695 030 cuyes en el Perú (INEI, 2012), la cual probablemente este subestimada siendo realmente la población actual de más de 24 millones en realidad (S. Morales, Lima, comunicación personal), lo que significa la mayor población a nivel mundial. Su importancia ha venido aumentando en las últimas décadas tanto económicamente como nutricionalmente, ya que es una fuente alimenticia de alto valor para las poblaciones de la sierra, y últimamente costa y selva del Perú, contribuyendo a la seguridad alimentaria del país (Chauca, 1997).

Dentro de las causas de pérdida económica en esta explotación pecuaria, están los problemas sanitarios, principalmente la salmonelosis, cuya presencia varía de porcentajes de presentación de 61% hasta 95% (Ramírez, 1972; Matsuura, 2008), siendo los serovares Typhimurium y Enteritidis los más aislados (Fox *et al.*, 1984). La importancia de esta enfermedad, como se ve, radica en su rápida evolución lo que conlleva a una alta mortalidad reportada en brotes infecciosos, disminuyendo la productividad de la crianza y desalentando la mayor inversión del productor en esta actividad pecuaria (Chauca, 2007), por ello la detección oportuna de sus agentes etiológicos es crucial para poder combatirla.

Actualmente el método convencional de detección de *Salmonella* spp. es el análisis microbiológico que consiste en enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, aislamiento en agar diferencial y confirmación mediante pruebas bioquímicas y serotipificación (ISO, 2002; FDA, 2007), lo que en total puede tomar hasta 1 semana para obtener resultados; por otro lado, recientemente se adaptó con éxito un protocolo de PCR

Múltiple para identificar *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis aislados de cobayos, el cual amplifica simultáneamente fragmentos de 284 pb del gen *InvA* específico del género *Salmonella*, fragmentos de 559 pb del gen *fliC* específico del serovar Typhimurium y fragmentos de 185 pb del gen *Prot6E* específico del serovar Enteritidis (Jamshidi 2010; Marcelo, 2015). Por otro lado, estudios previos (Matias *et al*, 2010; Mainar-Jaime *et al* 2013) han demostrado que se puede identificar *Salmonella* mediante la PCR tan solo después del pre-enriquecimiento no selectivo de las muestras.

Es de suma importancia contar con un método de detección de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis que sea práctico y consuma menos tiempo para poder tomar medidas de control más rápidas, contrarrestando las considerables pérdidas económicas que trae consigo la presentación de esta enfermedad en la producción de cuyes, por ello el presente estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad de detección de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis de la PCR Múltiple a partir de muestras sometidas a pre-enriquecimiento no selectivo y hallar la concordancia entre esta y el método convencional de análisis microbiológico para detectar *Salmonella* spp., para de esta manera poder introducir este nuevo método como procedimiento de rutina que nos brinde resultados para grandes cantidades de muestras en menos tiempo que el análisis microbiológico convencional.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. La producción de cuyes en el Perú

1.1. Situación actual

El cuy (*Cavia porcellus*), es una especie originaria de la zona Andina del Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia, es un producto alimenticio nativo, de alto valor nutritivo y bajo costo de producción, que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos, se cría fundamentalmente con el objeto de aprovechar su carne (MINAG, 2008). Sin lugar a dudas el cuy es la especie más popular dentro de las utilizadas para la alimentación del hombre andino, está identificado con la vida y costumbres de la sociedad indígena, utilizado también en medicina, como mascota, animal experimental y hasta en rituales mágico-religiosos (Chauca, 1997).

La distribución de la población de cuyes en Perú y Ecuador es amplia, se encuentra en casi la totalidad del territorio, en Colombia y Bolivia su distribución es regional por lo que manejan poblaciones menores. Se desarrolla bien en climas templados, pudiendo adaptarse más a climas fríos que calientes (Chauca, 2007). El Perú cuenta con una población de 12 695 030 cuyes (INEI, 2012), la cual podría estar subestimada, siendo realmente más de 24 millones en total (S. Morales, Lima, comunicación personal), lo que significa la mayor de Latinoamérica, siendo Cajamarca, Cuzco, Ancash, Apurímac, Junín y Lima, en ese orden, los departamentos con mayor producción de cuyes en el Perú (INEI, 2012).

El desarrollo de la crianza de cuyes en el Perú se inicia a mediados de la década de los 60, luego, en 1970 se inició un programa de mejoramiento genético el cual ha dado sus frutos con la formación de líneas de alta producción; en la década de los 80, se continua el trabajo de mejoramiento genético y alimentación, finalmente en la década del 90, con las líneas Perú, Inti y Andina, la crianza de cuyes se torna en una actividad productiva (Chauca, 2007).

En nuestro país la crianza de cuyes se ha desarrollado y ha dejado de ser una crianza marginal para constituirse como una real alternativa de una especie productora de carne (Chauca, 2007). Se ha podido identificar tres diferentes niveles de producción, caracterizados por la función que esta cumple dentro del contexto de la unidad productiva. Los sistemas de crianza identificados son el familiar, el familiar-comercial y el comercial. El cuy en el sistema familiar da seguridad alimentaria a la familia y sostenibilidad al sistema de los pequeños productores. El sistema familiar-comercial y comercial generan una empresa para el productor, produciendo fuentes de trabajo para ellos mismos (Chauca, 1997).

1.2. Importancia

La pregunta que surge en nuestro país es ¿Cuándo los cuyes se hicieron importantes?, la respuesta es única y es que siempre los cuyes han sido importantes por el rol que tenían en las familias rurales. El cambio de visión de la crianza por parte del productor ha permitido incrementar la oferta, la crianza familiar se ha convertido en crianzas familiar-comercial (Chauca, 2007).

La importancia del cuy como especie, radica en sus enormes posibilidades de constituirse (como actividad económica) en el principal rubro empresarial; capaz de permitir utilidades comparativamente superiores a las generadas por otras actividades pecuarias. La creciente demanda de su carne, la disponibilidad de una nueva oferta tecnológica que en los últimos años permitió importantes avances en el mejoramiento genético, haciendo del cuy una especie eficiente en la conversión de alimentos, precoz y extraordinariamente prolífico; todo ello permite vislumbrar nuevas perspectivas de desarrollo competitivo de esta especie en los mercados regionales y nacionales (Gil, 2007).

Desde el punto de vista nutricional, la especie tiene grandes cualidades alimenticias y productivas. Así pues, la carne de cuy tiene altos estándares nutricionales, porcentaje de grasa menor al 10%, alta proteína (20.3%) y bajo contenido de colesterol (65mg/100g). Además, el cuy es un animal rústico, de ciclo de vida corto y facilidad de alimentación, su carne es apta para todos los grupos poblacionales, en diversas situaciones fisiológicas (Gil, 2007; Ordoñez, 2003).

El consumo de carne de cuy se ha incrementado de manera sostenida en el mercado de Lima, como resultado de una promoción del turismo gastronómico, la cocina novoandina, y la mayor presencia de platos tradicionales en los restaurantes o a la combinación de estos factores (MINAG, 2008). Se estima el consumo de carne de cuy en el Perú en 0.607 kg por habitante para el 2003. Sobre una base de una producción estimada de 16,500 TM de carne al año, supera en consumo a la carne de caprino (0,25 kg/hab/año) (MINAG, 2008).

Existe posibilidades de crecimiento del mercado actual pues un 28% de la población conoce el producto o es consumidor eventual y desearía hacerlo más seguido, bajo ciertas condiciones. Igualmente un 74% de la población es mercado potencial, comprendiendo a una población no consumidora pero abierta a un consumo futuro (Ordoñez, 2003).

Los supermercados son mercados potenciales muy interesantes pero exigentes. Demandan estándares de calidad y cuentan con certificadoras de calidad acreditadas. Por otro lado, por lo general tienen como política realizar contratos que garanticen una oferta continua y con características estándares del producto (MINAG, 2008).

La exportación de la carne de cuy se viene haciendo desde el 2000 (carcasas empacadas al vacío) con destino a Estados Unidos y Japón, cumpliendo con las especificaciones técnicas y de calidad exigidas por estos mercados, aunque en pequeñas cantidades aun (MINAG, 2008). La evolución de las exportaciones de carne congelada de cuyes registradas por el Perú en los últimos años, muestran un interesante ascenso en términos de volumen e ingresos monetarios; así, en el periodo comprendido entre el año 2001 y el primer semestre del 2007, las exportaciones alcanzaron un valor acumulado de US\$ 306 864.00 dólares americanos, monto muy importante entendiendo que proviene de un nuevo rubro de exportaciones de productos no tradicionales (Gil, 2007).

El desarrollo actual del mercado de cuyes para exportación viene orientando sus exigencias hacia la certificación sanitaria y de centros de beneficio y producción, actualmente existe una demanda en crecimiento de carne de cuy en los mercados extranjeros, en su mayor proporción este incremento es en forma estacional, presentándose mayormente en Noviembre y Diciembre (MINAG, 2008).

1.3. Problemática

La tecnología de producción mayormente difundida no responde a las nuevas exigencias de los mercados de exportación y otros importantes mercados nacionales, además las campañas de promoción por parte de las instituciones públicas y gobiernos regionales y locales para el consumo de carne de cuy y ventajas de su crianza aun resultan insuficientes (MINAG, 2008). Por otra parte, una principal limitante siempre es la tierra para el cultivo de los forrajes que se utiliza en la alimentación de los cuyes (Chauca, 2007).

La alta informalidad en la crianza del cuy está vinculada a la intensa actividad domestica de las familias rurales. Esto ha propiciado una oferta poco diferenciada debido al escaso desarrollo de canales de distribución comercial. Además de la alta barrera para la crianza tecnificada, el pequeño criador afronta un riesgo sanitario cuando las enfermedades que puede contraer el cuy no son tratadas oportunamente por la falta de recursos (Chirinos *et al.*, 2008).

Las Universidades a nivel nacional han realizado investigaciones complementarias que han fortalecido la investigación en cuyes. Se ha avanzado en las disciplinas de Nutrición y Alimentación, Manejo pecuario y Mejoramiento genético, pero poco se ha hecho en Sanidad Animal. Los problemas sanitarios se previenen con prácticas de manejo, pero debe estudiarse su forma de control y prevención ya que el crecimiento de la crianza exige tener cubierto el riesgo sanitario para que el productor pueda invertir a una mayor escala de producción (Chauca 2007).

Por problemas sanitarios se tiene la mayor merma por lo que se viene identificando las causas de mortalidad, dentro de las más comunes están la neumonía causada por *Streptococcus pneumoniae* (neumococos), la bronconeumonía causada por *Bordetella bronchiseptica*, la pseudotuberculosis causada por *Yersinia pseudotuberculosis* que ocasiona septicemia con focos de infección nodulares y la

linfadenitis causada por *Streptococcus zooepidemicus* (grupo C) o *Streptobacillus* que forman abscesos en los linfonodos cervicales; pero según demuestran los estudios sobre sanidad, la enfermedad más grave que afecta a los cuyes es la salmonelosis debido a que son bastante susceptibles (especialmente los lactantes) y puede estar en estado de latencia, bastando una condición de stress para que se active la enfermedad causando una alta mortalidad y aparición de abortos en toda la producción (Chauca, 1997).

2. La salmonelosis en el cuy

2.1. Generalidades

2.1.1. Agente etiológico

La primera descripción de bacterias del género *Salmonella* se remonta a finales del siglo XIX, cuando Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith aislaron *Salmonella Choleraesuis* en muestras tomadas en un cerdo con peste porcina clásica, creyendo que era el agente de esta enfermedad. El bacteriólogo francés Joseph Léon Marcel Lignières sugirió en 1900 que estas bacterias se denominaran *Salmonella*, en honor a Salmon (García, 2011).

Su hábitat principal es el tracto intestinal del hombre y los animales, destacan por su gran capacidad de adaptación, lo que les permite infectar a un amplio rango de hospedadores, y crecer en un amplio rango de temperaturas (7-48°C) y pH (4-8). Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, de 0.7 – 1.5 x 2.0 – 5 µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*), son anaerobios facultativos no esporulados, catalasa positivos, oxidasa negativos. No fermentan la lactosa (excepto *S. entérica* subesp. *arizonae* y *S. entérica* subesp. *diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. Typhi*); no producen indol; no degradan urea, pero si decarboxilan lisina y ornitina (Caffer *et al.*, 2008; Garcia, 2011).

2.1.2. Taxonomía y nomenclatura

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*, de acuerdo a la última nomenclatura, el género *Salmonella* consiste de 2 especies principales: *S. enterica* y *S. bongori*, la primera está dividida en 6 subespecies, tal y como se muestra en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Nueva nomenclatura para subespecies de *Salmonella enterica* (OIE, 2010).

Subespecie original	Nomenclatura actual
Subespecie I	Subespecie <i>enterica</i>
Subespecie II	Subespecie <i>salamae</i>
Subespecie IIIa	Subespecie <i>arizonae</i>
Subespecie IIIb	Subespecie <i>diarizonae</i>
Subespecie IV	Subespecie <i>houtenae</i>
Subespecie VI	Subespecie <i>indica</i>

Las cepas de *Salmonella* son clasificadas en serovares de acuerdo a la extensiva diversidad de antígenos de lipopolisacáridos (O) y antígenos flagelares (H), de acuerdo al esquema de Kauffmann-White; actualmente más de 2500 serovares son reconocidos, este número está creciendo constantemente. Los serovares que comúnmente causan infecciones en humanos y animales de producción, pertenecen a la subespecie *enterica*, los serovares de las otras subespecies se encuentran mayormente en animales de sangre fría y en el ambiente, pero ocasionalmente están asociados a enfermedades en los humanos. Algunos de los más importantes serovares son *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Cholerasesuis*, *S. Paratyphi*, *S. Gallinarum* y *S. Enteritidis* (Lahiri *et al.*, 2010; OIE, 2010).

En la práctica clínica los nombres de las subespecies no necesitan ser indicados debido a que solo los serovares de la subespecie *enterica* poseen un nombre, el género *Salmonella* seguido del nombre del serotipo deben ser usados para la práctica de rutina (Ejem: *Salmonella* Typhimurium en vez de *S. entérica* subespecie *entérica* serovar Typhimurium). Los serovares de las otras subespecies son designados por una fórmula antigénica, incluyendo la subespecie designada por números romanos (Ejem: *Salmonella* IV 48:g.z51) (OIE, 2010).

2.2. Epidemiología

La *Salmonella entérica*, se encuentra ampliamente distribuida y en nuestro país ha sido aislada como agente de salmonelosis en cobayos en zonas de la Costa, desde Barranca hasta Chilca; en la Sierra, en el Valle del Mantaro, y en la Selva en Chanchamayo (Aliaga, 1995). Los serotipos que se han reportado en infecciones naturales

y experimentales en cobayos alrededor del mundo son *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Florida*, *S. Bredeney*, *S. Pomona*, *S. Dublin*, *S. Ochigou* y *S. Limite* (Garmendia *et al.*, 2000). Siendo *Salmonella Typhimurium* y *Enteritidis* las más comunes aisladas en cobayos (Fox *et al.*, 1984), las cuales han sido reportadas últimamente relacionadas a casos de zoonosis en humanos (Bartholomew *et al.*, 2014; Fournier *et al.*, 2015),

Salmonella Typhimurium es la que tiene 95% de implicancia con relación a los demás serotipos que se presentan en infecciones naturales en el Perú. Dependiendo de la edad, los cuyes manifiestan grados de susceptibilidad a la salmonelosis, los animales en lactación registran valores desde 15% hasta de 52.70%, los adultos entre 30.65% y 32.5% y los de recría van de 19.83% a 52.5% (Ramirez, 1972; Chauca, 1997; Matsuura, 2008).

Entre los mamíferos en general, la enfermedad clínica es más común en los animales muy jóvenes, preñados o lactantes, y, generalmente, ocurre después de un acontecimiento estresante. Los brotes con un alto índice de morbilidad y, a veces, un alto índice de mortalidad son típicos en rumiantes, cerdos y aves de corral jóvenes. En brotes de septicemia, los índices de morbilidad y mortalidad pueden ser de aproximadamente el 100%. La salmonelosis es poco frecuente en mamíferos y aves adultas sanas y sin estrés, y, comúnmente, ocurren casos esporádicos. La enteritis aguda es particularmente grave en caballos, y el índice de mortalidad para esta especie puede ser de casi el 100%. Ocasionalmente se registran muertes o enfermedades en reptiles, pero parecen ser poco frecuentes (CFSPH, 2005).

Los serotipos o serovares de *Salmonella* pueden ser clasificados en grupos del punto de vista epidemiológico, según estén más o menos adaptados a una especie hospedadora. Así existen serovariedades adaptadas estrictamente a un hospedador específico (*S. Typhi* en el hombre, *S. Gallinarum* en las aves), serovariedades adaptadas a un hospedador específico pero que pueden aislarse en otros hospedadores (*S. Cholerasuis* en cerdos y humanos) y serovariedades no adaptadas a hospedadores específicos (*S. Typhimurium* en gran variedad de animales) (García, 2011).

2.3. Transmisión y Patogenie

2.3.1. Transmisión

Esta enfermedad tiene como vía de infección la fecal-oral, la principal fuente de infección son los alimentos contaminados por las heces, pero también se puede transmitir

in utero y a través de la leche en los mamíferos, y de manera vertical en las aves, con contaminación de la membrana vitelina, albumen y posiblemente la yema de huevo. En explotaciones pecuarias comerciales, los roedores y aves silvestres se comportan como vectores mecánicos al contaminar los alimentos con sus deyecciones, de igual manera el personal que maneja a los animales puede transportar la bacteria por medio de fómites cuando manipula el forraje y otros alimentos (Chauca, 1997; CFSPH, 2005).

Algunos factores predisponentes a la infección en cuyes específicamente, incluyen la edad (gazapos o adultos), el estrés (preñez, destete, movimiento de animales, etc), deficiencias nutricionales, genética, serotipo infectante, medio ambiente (iluminación, ventilación, etc), variaciones de temperatura y humedad (Canchari, 1995).

Se han encontrado *Salmonella* spp. en todas las especies de mamíferos, aves, peces, anfibios y reptiles estudiados, los últimos se comportan como portadores asintomáticos y siempre deben ser considerados una fuente potencial de *Salmonella*. Todas las especies parecen ser susceptibles a la salmonelosis en las condiciones adecuadas, sin embargo la enfermedad clínica es más frecuente en el ganado vacuno, los cerdos y los caballos, y es relativamente poco común en los gatos y perros, pero en ambos casos suele presentarse con enteritis que se manifiesta a menudo con diarrea sanguinolenta o acuosa profusa con pirexia, adicionalmente se puede presentar un amplio rango de signos clínicos como septicemia, aborto, artritis, necrosis de extremidades y enfermedad respiratoria; cabe mencionar que la enfermedad no presenta signos patognomónicos (CFSPH, 2005; OIE, 2010).

La salmonelosis en animales de producción juega un importante rol en la salud pública y particularmente en la seguridad alimentaria, debido a que los productos de origen animal son considerados como la mayor fuente de contagio para las infecciones por *Salmonella*. Programas especiales han sido implementados para la vigilancia de las aves de corral, cerdos y ganado, incluyendo a los animales que puedan ser portadores subclínicos de *Salmonella* (OIE, 2010).

2.3.2. Patogenie

2.3.2.1. Biología celular de la infección de *Salmonella*

Diversos estudios de la infección de *Salmonella* han revelado que inmediatamente después de la infección, estas se asocian a las placas de Peyer en el íleon terminal, las

cuales son parte del GALT y están cubiertas por el epitelio asociado al folículo (FAE), donde se encuentran las células M (Células de micropliegue), que internalizan eficientemente antígenos del lumen intestinal para ser transportados a los linfocitos subyacentes los que se encargan de inducir la respuesta inmune de mucosas, si bien este mecanismo ayuda a desarrollar un mejor respuesta, también deja a la mucosa altamente susceptible al ataque de patógenos entéricos debido a la ausencia de glicocalix y borde de cepillo en las células M, facilitando la adherencia e internalización de estos patógenos, de ahí que sirva de entrada para *Salmonella* a los macrófagos y células dendríticas a lo largo del epitelio intestinal, donde empiezan su diseminación vía linfática y sanguínea a los linfonódulos mesentérico, hígado y bazo (Sánchez y Cardona, 2003; Brodsky *et al.*, 2005; Lahiri *et al.*, 2010).

La infección de *Salmonella* produce un rearrreglo del citoesqueleto de las células M, resultando en la internalización de la bacteria por macropinocitosis, ingresando en vacuolas y obteniendo nutrientes de ellas para luego iniciar el transporte a los linfocitos subyacentes, esto causa citotoxicidad en las células M (en 120 minutos las células M están completamente destruidas) y una ruptura de la citoarquitectura del FAE, permitiendo a *Salmonella* infectar los enterocitos adyacentes. Se ha demostrado que el locus *inv* y la *lpf* (Chaperona de ensamblado fimbrial) están involucrados en la adherencia específica *Salmonella* - Células M, por otro lado, el SPI1 (Isla de patogenicidad – 1 de *Salmonella*) juega un rol importante en la invasión epitelial tanto como la expresión selectiva de la proteína caveolina-1 por parte de las células M, mejorando la transcitosis de *Salmonella*, finalmente, algunos estudios han identificado el rol del gen *sly* en la citotoxicidad selectiva en las células M (Leung y Finiay, 1991; Lahiri *et al.*, 2010).

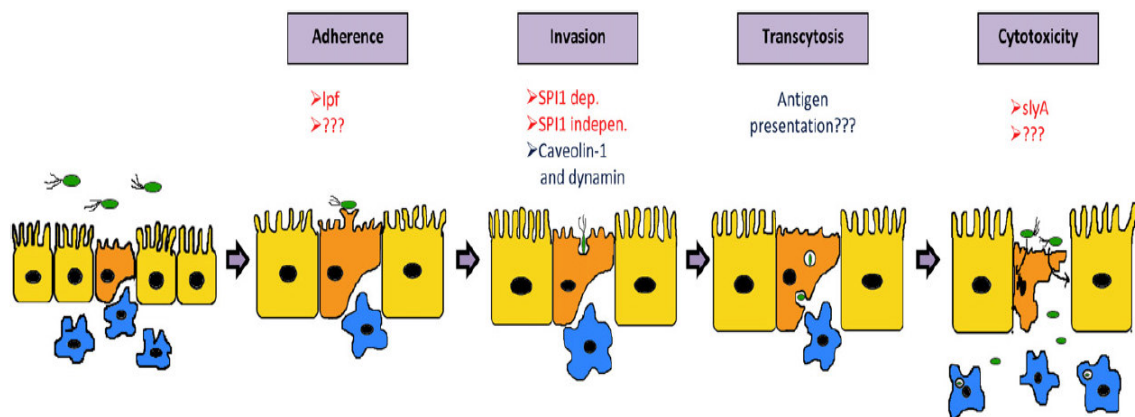


Figura 1. Rol de las células M en la infección por *Salmonella* (Lahiri *et al.*, 2010).

2.3.2.2 Evasión de la respuesta inmune del hospedero

El hospedero tiene diversos mecanismos para combatir el ataque de *Salmonella*. Las células del epitelio gastrointestinal actúan como barrera física primaria en contra de la infección por *Salmonella*. Las células de Paneth producen péptidos antimicrobianos, también las citoquinas y quimioquinas aumentan tras la infección, contribuyendo a la respuesta inflamatoria contra *Salmonella*. La biosíntesis del flagelo y las fimbrias también juegan un rol crucial en la entrada a las células epiteliales. Otro factor importante para la invasión en las células epiteliales es el antígeno O (Lahiri *et al.*, 2010).

El conocimiento de la secuencia del genoma completo de *Salmonella* ha revelado que ha adquirido algunas islas de patogenicidad mediante la transferencia horizontal de genes. La invasión y la sobrevivencia intracelular esta mediado por al menos 60 genes de virulencia localizados en varias islas de patogenicidad, hasta el momento 12 de ellas han sido identificadas, principalmente el Sistema de secreción tipo tres I (T3SSI) y el Sistema de secreción tipo tres II (T3SSII), que inyectan cohortes de proteínas efectoras bacterianas que sabotean la transducción y el tráfico de membrana del hospedador (Lahiri *et al.*, 2010).

La isla de patogenicidad – 2 de *Salmonella* (SPI2) codifica un sistema de secreción tipo III, que es esencial para la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos, previniendo la unión del SCV y el NADPH oxidasa y dando a la bacteria una ventaja para sobrevivir en el hospedero (Lahiri *et al.*, 2010).

2.3.2.3. Sobrevivencia en el hospedero

Salmonella tiene la habilidad de sobrevivir dentro de células de mamífero como macrófagos y células no fagocíticas, dentro de un fagosoma modificado llamado Vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV por sus siglas en inglés), a la vez también puede contrarrestar defensinas, especies de oxígeno reactivo e intermediarios del nitrógeno, producidos por el hospedero. Lo que es más, se sabe que algunas *Salmonellas* virulentas inhiben la fusión del SCV con el NADPH oxidasa, conllevando a un incremento en la sobrevivencia bacteriana en los macrófagos (Lahiri *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que *Salmonella* puede cruzar la barrera hematoencefálica en el modelo murino, por lo tanto se tendrá que tener en cuenta la propiedad de colonización del cerebro en futuras cepas vacunales de *Salmonella*. Por otra parte, se ha demostrado

que *Salmonella* se multiplica en las células epiteliales de la vesícula biliar sin ser trasladada a la mucosa, lo que es más, crea biopelículas en los cálculos biliares, haciendo resistencia y emergiendo luego para hacer la enfermedad crónica (Lahiri *et al.*, 2010).

2.4. Signos clínicos y lesiones

2.4.1. Signos clínicos

La presentación de la enfermedad en la forma aguda, se caracteriza por un cuadro septicémico (Orson, 1972), muriendo los animales en un lapso de 24 a 48 horas por muerte hiperaguda, depresión grave, deterioro rápido, letargo y disnea (Ramírez, 1972). A parte del decaimiento y la postración; puede haber erizamiento de pelos, diarrea, anorexia, signos nerviosos y parálisis de los miembros posteriores debido a la afección de la medula espinal, habiéndose aislado la bacteria de cuadros de meningitis. Algunas veces diarrea acompañada de mucus y en cuyes gestantes se producen abortos. En los casos crónicos, es notorio un adelgazamiento paulatino, pelaje deslucido aumento del volumen del vientre debido a ascitis (Simeone y Aramburu, 1967; Chauca, 1997).

En reptiles la enfermedad clínica es poco frecuente. Los síndromes que han sido registrados incluyen septicemia (caracterizada por anorexia, apatía y muerte), osteomielitis, osteoartritis y abscesos subcutáneos. En aves muy jóvenes, se registran casos más sintomáticos. Los síntomas pueden incluir anorexia, letargo, diarrea, mayor sed y signos en el SNC (CFSPH, 2005).

En rumiantes, cerdos y caballos los síndromes más importantes son enteritis y septicemia. La enteritis aguda es la forma más común en los animales adultos, y en terneros de más de una semana de edad. Esta forma se caracteriza por diarrea profusa, deshidratación, depresión, dolor abdominal y anorexia. Las heces son de acuosas a pastosas, usualmente con olor nauseabundo y pueden contener moco, partes de membrana mucosa, cilindros o sangre. Los caballos, en especial, con frecuencia padecen de enteritis grave y pueden morir dentro de las 24 a 48 horas. En los perros y gatos, la forma más común es diarrea aguda, con o sin septicemia. También es posible observar neumonía, abscesos, meningitis, osteomielitis, celulitis o conjuntivitis. En los gatos, se ha registrado una enfermedad febril crónica caracterizada por anorexia y letargo, pero no diarrea. Las perras y gatas preñadas pueden abortar o dar a luz cachorros o gatitos débiles (CFSPH, 2005).

2.4.2. Lesiones

Las lesiones agudas de la salmonelosis en cobayos implican al hígado, bazo, tejidos linfoides y el intestino (aumento de tamaño, congestión, abscesos y necrosis focal). En el tracto gastrointestinal puede haber aumento de gas y líquido, además de disminución del grosor de la pared intestinal. Las lesiones en casos subagudos a crónicos pueden demostrar focos necróticos amarillentos en el hígado y demás vísceras, con hiperemia, hiperplasia de las placas de Peyer, hepatomegalia, esplenomegalia y pulmones congestionados. En el tracto reproductivo puede haber focos necróticos en el miometrio y abortos. Una lesión frecuentemente observada es la presencia de pseudomembranas en la superficie hepática, ofreciendo el cuadro de perihepatitis, con la vesícula biliar distendida y llena de líquido (Parra *et al.*, 2002; Figueroa y Verdugo, 2005).

Microscópicamente, se puede apreciar esplenitis y linfadenitis con áreas de necrosis rodeadas de células mononucleares y neutrófilos (nódulos paratifoideos). En el hígado puede haber además una hepatitis granulomatosa focal o multifocal, esta lesión se encuentra en diversos grados de evolución, reconociéndose a las fases de reparación (fase proliferativa de la inflamación) como granuloma hepático; en los animales lactantes se puede observar cambio graso y congestión hepática. El hígado es el órgano con mayor frecuencia de lesiones, seguido por el intestino, pulmón y bazo (Ameghino, 1968; Layme, 2009).

2.5. Toma de muestras para el diagnóstico

En el caso de animales de producción se prefiere muestras en pool y no individuales, del ambiente, heces, desperdicios, polvo o hisopado de botas. Hay que tener en cuenta que los serovares hospedero-específico deben de ser aislados de los órganos infectados y en el caso de ser cuadros subclínicos, se recomienda incrementar el tamaño de la muestra y hacer repeticiones, trabajando siempre en pool (OIE, 2010).

Cada trozo de tejido se debe colocar en una bolsa de plástico independiente perfectamente rotulada o en un frasco con tapa de rosca. Se utiliza instrumental esterilizado para la recogida de especímenes destinados a cultivo microbiológico, y hay que tener un cuidado especial de no contaminar los tejidos con contenido intestinal. No se utilizan desinfectantes sobre o cerca de los tejidos que sirven de muestra para cultivo

bacteriológico o para aislamientos virales. Los envases utilizados para el envío de muestras deben ser en lo posible irrompibles, herméticos y de dimensiones adecuadas; el tiempo entre la obtención de la muestra y su llegada al laboratorio no debería ser superior a 24 horas. Los especímenes se envían al laboratorio por el procedimiento más rápido posible. Si las muestras llegan al laboratorio antes de 48 horas, se deben enviar refrigeradas. (SENASA, 2014).

Se ha reportado en cuyes que los órganos blanco de lesión en los casos de salmonelosis sistémica, son el hígado y el bazo, ya que se logra aislar con mayor frecuencia de esos órganos a *Salmonella enterica* (Matsuura, 2008), además en casos confirmados, el hígado es el que presenta lesiones inflamatorias con más frecuencia que otros órganos (Layme, 2009).

2.6. Tratamiento

En un estudio realizado por Matsuura (2008) en cepas aisladas de casos clínicos de tejidos de cobayos en la provincia de Carhuaz, se llegó a comprobar que el 100% de los aislamientos de *Salmonella entérica* son sensibles frente a enrofloxacin, sulfatrimetoprim y estreptomicina, sugiriendo que estos antimicrobianos son una buena opción para el tratamiento de la enfermedad en cobayos.

Algunos autores recomiendan alternativas como el uso del cloranfenicol a concentración de 0.5 g/L agua y a dosis de 5 ml/animal por 5 a 7 días, también la furazolidona 5.5%, una cucharadita/L agua en dosis de 2 ml/animal, y el Ácido Oxolinico 4 g/10 L agua, a dosis de 1 ml/kg peso vivo (Canchari, 1995).

2.7. Prevención y Control

Las salmonelas son sensibles a las altas temperaturas, a un pH menor a 4 y a desinfectantes como el hipoclorito de sodio al 1% y etanol al 70%. Por ende, para la prevención es importante evitar la contaminación fecal de las fuentes de agua y alimento, evitar el decaimiento o estrés de los animales, control de la temperatura y humedad del galpón, efectuar desinfecciones periódicas en las instalaciones y el material contaminado debe ser eliminado; evitar la introducción de nuevos animales sin antes haberlos sometido a un periodo de observación no menor de 20 días, y controlar la presencia de portadores, los cuales deben ser aislados y tratados, o sacrificados; es importante también el control de roedores y aves externas (Canchari, 1995; CFSPH, 2005).

En un estudio realizado por Mattos (2007), se recomienda el uso de la muña (*Satureja parvifolia*) en una dosis máxima de 4% con respecto al total de la dieta ya que estimula el crecimiento de *Lactobacillus* spp., y a su vez este actúa controlando la infectividad de *Salmonella* spp.

3. Detección microbiológica convencional de *Salmonella* spp.

La mayoría de los métodos de análisis microbiológico tienen las siguientes etapas: pre-enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo y posteriormente, la siembra en medio sólido selectivo e indicador (García, 2011), tal es el caso del ISO 6579:2002, el cual aún no está validado para muestras de medio ambiente, alimentos para animales y heces, por lo tanto el nuevo ISO 6579:2002 Anexo D ha sido adaptado de manera efectiva siendo más simple y económico que el ISO entero. Básicamente consisten en 4 etapas (Feldsine, 2003), pre-enriquecimiento en Agua Peptonada Tamponada (APT), enriquecimiento en Rappaport-Vassiliadis semi-sólido, aislamiento en Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y un agar adicional de elección (OIE, 2010).

3.1. Pre-enriquecimiento no selectivo

El número de *Salmonella* en heces de animales asintomáticos, muestras ambientales, alimento animal y alimento humano, usualmente es bajo, por lo que se utiliza el Pre-enriquecimiento en Agua Peptonada Tamponada o Caldo de pre-enriquecimiento universal. Esto permitirá a las *Salmonellas* multiplicarse o reactivarse después de algún daño por calor, frío, ácidos orgánicos, fagos, etc. El caldo de pre-enriquecimiento no será de elección para aislar *Salmonellas* adaptadas al hospedador, desde las heces, ya que existe competencia con el resto de microorganismos en estas muestras (OIE, 2010).

Los medios que se utilizan actualmente son, el caldo de pre-enriquecimiento universal (UPB), el medio M9 y el Agua Peptonada Tamponada (APT), entre otros que no incluyan en su composición azúcares fermentables y tengan una gran capacidad tampón (García, 2011). La ISO (2002) y FDA (2007) establece el uso de Agua Peptonada Tamponada (APT) para incubar la muestra en proporción 1:9 con el APT, a un rango de temperatura de 35° - 37° C y por un tiempo de 18 – 24 horas

3.2. Enriquecimiento Selectivo

Se utiliza medios líquidos o semi-sólidos que contienen aditivos los cuales permiten crecer a *Salmonella* mientras que inhiben el crecimiento de otra bacteria. Algunos medios son relativamente tóxicos para algunos serovares, por ejemplo, el selenito inhibe a *S. Choleraesuis*, el verde brillante es tóxico para muchas cepas de *S. Dublin*. Las temperaturas elevadas son usadas para incrementar la selectividad de los medios de enriquecimiento, la mayoría de laboratorios usa 43°C, aunque esto puede ser inhibitorio para algunas cepas sensibles a temperatura, especialmente *S. Dublin*, por eso ahora 41.5°C es recomendado para la incubación en Rappaport-Vassiliadis. También el enriquecimiento selectivo por motilidad podría aumentar la selectividad para *Salmonella*. Algunas veces podría resultar ventajoso utilizar 2 medios de enriquecimiento así como 2 agares selectivos para la misma muestra. Adicionalmente se puede agregar Ferrioxamina E para muestras de nutrientes limitados como huevos, agua o suelo, también antibióticos como novobiocina para suprimir la mayoría de Gram Positivos y otros Gran Negativos (OIE, 2010).

Al igual que el tetrationato, el caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) es uno de los medios recomendados en la norma ISO 6579:2002 para el aislamiento de *Salmonella*. La acción de este caldo se basa en la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir y multiplicarse en presencia de verde malaquita, con una osmolaridad elevada, un bajo aporte de nutrientes y un pH relativamente bajo (García, 2011). La ISO (2002) y la FDA (2007) establecen el uso de medio Rappaport-Vassiliadis o Caldo tetrationato para incubar la muestra en una proporción de 1:10 o 0.1:10 con respecto al medio, a una temperatura de $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$, el tiempo de incubación varía de 24 a 48 horas; en el caso del caldo tetrationato la incubación es por 24 ± 2 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.3. Aislamiento en agar selectivo y diferencial

Para el aislamiento se utilizan medios diferenciales y selectivos como: agar MacConkey (MC), agar Eosina Azul de Metileno (EMB), agar *Salmonella Shigella* (SS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Hektoen (HE), agar Verde Brillante (BG) (Caffer *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Características de las colonias de *Salmonella* spp. en medios selectivos y diferenciales (Caffer *et al.*, 2008)

Medio de cultivo	Selectividad	Aspecto de la colonia
Agar MacConkey	Baja	Incolora
Agar EMB	Baja	Incolora
Agar SS	Alta	Incolora con centro negro
Agar XLD	Alta	Roja con centro negro
Agar HE	Alta	Verde-azulada con centro negro
Agar BG	Alta	Rosada pálida

Son medios solidos que permiten diferenciar principalmente las características bioquímicas, usualmente la no fermentación de lactosa y la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S). Los resultados se pueden leer después de 24 a 48 horas de cultivo a 37°C. Existen algunas colonias atípicas que son más eficientemente detectadas cuando se usan medios selectivos semisólidos como el DIASALM (Diagnostic Salmonella selective semi-solid médium), siendo efectivos también cuando se usa el test de aglutinación con antisueros polivalentes O y H. Hay casos especiales como el de *Salmonella* Abortusovis que son de lento crecimiento y se deben incubar por 72 horas en agares no selectivos como el Agar sangre (OIE, 2010).

La eficacia de estos medios solidos va a depender en gran medida de la eficacia de los medios de enriquecimiento selectivos empleados en la etapa inmediatamente anterior del aislamiento, es por eso que se sugiere utilizar diferentes combinaciones de medios de enriquecimiento y de medios solidos selectivos con el fin de elevar la sensibilidad y facilitar el aislamiento de distintos serotipos (García, 2011). La ISO (2002) y la FDA (2007) establecen que se deben utilizar 2 tipos de medios selectivos para este paso, el Agar XLD y otro complementario como el Agar Bismuto Sulfito o Agar Hektoen entérico, inoculando el contenido del asa (1 - 10 µl) e incubándolos de 35 a 37 °C por 24 ± 3 horas.

3.3.1. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

El medio contiene: extracto de levadura, xilosa, lactosa, sacarosa, lisina, desoxicolato, tiosulfato, citrato de hierro amoniacal, rojo fenol, sales (Caffer *et al.*, 2008).

Es un medio de selectividad moderada a alta por su baja concentración de sales biliares, que permite ser usado con *Salmonella* y *Shigella*. La degradación de xilosa,

lactosa y sacarosa produce acidez que hace virar el rojo de fenol (indicador de pH) al amarillo. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la producción de H₂S. La decarboxilación de la lisina a cadaverina se visualiza por la presencia de un color rojo púrpura por aumento del pH. El desoxicolato inhibe Gram (+). La diferenciación de *Salmonella/Shigella* de otras enterobacterias se basa en tres reacciones: fermentación de xilosa, decarboxilación de lisina y producción de H₂S. La xilosa diferencia *Shigella* de *Providencia* que no fermenta xilosa o lo hace muy lentamente; la lisina diferencia *Salmonella* de los fermentadores de xilosa no patógenos, pues producen colonias inicialmente amarillas debido a la utilización de xilosa y colonias rojas retardadas por la descarboxilación de la lisina. La lactosa y la sacarosa en exceso evitan que los coliformes lisina positiva reviertan la condición alcalina de los microorganismos consumidores rápidos de xilosa/lisina. La producción de H₂S ocurre en condiciones alcalinas dando colonias con centro negro, similar al agar Hektoen Enterico (HE); en condiciones ácidas la precipitación negra se inhibe (Caffer *et al.*, 2008; Koneman *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Aspecto de colonias en agar XLD (Caffer *et al.*, 2008).

Bacteria	Aspecto de colonia
<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Aeromonas</i>	Amarilla, opaca, con precipitado
<i>Klebsiella</i>	Amarilla, opaca, mucosa, c/precipitado
<i>Citrobacter</i>	Amarilla, opaca, centro negro
<i>Serratia</i> , <i>Hafnia</i>	Amarilla, opaca
<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	Amarilla, translúcida, centro negro
<i>Salmonella</i>	Igual color del medio, centro negro
<i>Shigella</i> , <i>Providencia</i>	Igual color del medio, translúcida
<i>S. Typhi</i>	Amarilla, ligeramente opaca

3.4. Identificación de *Salmonella* spp. mediante pruebas bioquímicas

El último paso del análisis microbiológico es confirmar que las colonias seleccionadas pertenecen al género *Salmonella*. Esta confirmación se realiza generalmente, en primer lugar, mediante pruebas bioquímicas y, posteriormente, mediante identificación serológica (García, 2011).

La mayoría de serovares (99.8%) de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente, pertenecen a *Salmonella entérica* subesp. *enterica* (I) y tienen propiedades bioquímicas características, siendo la excepción los serovares *S. Typhi* y *S. Paratyphi* (Caffer *et al.*, 2008).

**Cuadro 4. Pruebas bioquímicas de *Salmonella entérica* subesp. *enterica* (I).
(Garcia, 2011).**

Prueba Bioquímica	Reacción	Prueba Bioquímica	Reacción
Motilidad	+	Glucosa (fermentación)	+
Oxidasa	-	Sacarosa (fermentación)	-
Hidrolisis de la Urea	-	Lactosa (fermentación)	-
Indol	-	Xilosa (fermentación)	+
Producción de H ₂ S	+	Lisina decarboxilasa	+
Utilización de Citrato	+		

Algunas cepas de *Salmonella* spp. se pueden confundir con otras enterobacterias productoras de S₂H como *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii* que son comensales del aparato digestivo de los animales de sangre caliente, pero que no son enteropatógenos (Caffer *et al.*, 2008).

La ISO (2002) y la FDA (2007) han establecido el Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO) y Agar Urea como pruebas bioquímicas de primera mano para identificar *Salmonella* spp., adicionalmente también se pueden realizar la prueba de ONPG, Agar citrato de Simmons y caldo RMVP. Se debe trabajar con 2 colonias como mínimo aisladas del Agar Selectivo.

3.4.1. Agar Hierro Triple Azúcar (TSI):

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (H₂S). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de H₂S. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de H₂S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio (Caffer *et al.*, 2008).

Para la detección de sulfuro de hidrógeno, que es incoloro, el medio debe incluir un indicador. El tiosulfato de sodio es la fuente de átomos de azufre en la mayoría de los medios usados para la producción de sulfuro de hidrógeno. Las sales de hierro (sulfato

ferroso y férrico, citrato de amonio) se incorporan al medio de cultivo y reaccionan con sulfuro de hidrógeno para producir un precipitado negro insoluble (sulfuro de hierro). Se requiere un medio ácido para que un microorganismo produzca sulfuro de hidrógeno y, por lo tanto, debe proveerse una fuente de iones hidrógeno. Dado que la profundidad de los tubo se vuelve ácida con la fermentación de la glucosa (los iones hidrógeno aumentan), a menudo el ennegrecimiento se ve por primera vez allí, particularmente con bacterias no fermentadoras de lactosa. Por lo tanto el negro profundo debería ser leído como ácido si el color amarillo usual se oscurece con un precipitado negro. El medio TSI es menos sensible en la detección de sulfuro de hidrógeno que los medios que contienen hierro, como el medio sulfuro indol movilidad (SIM) (Koneman *et al.*, 2004).

Cuadro 5. Crecimiento de enterobacterias en TSI (Caffer *et al.*, 2008).

Bacteria	Estría	Punción	H ₂ S
<i>Salmonella</i> Typhi	K	A	+
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	K	A c/g	-
<i>Salmonella</i> spp.	K	A	+
<i>Shigella</i> spp.	K	A	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A	A c/g	-
<i>Escherichia coli</i>	A	A c/g	-
<i>Citrobacter</i> spp.	A	A c/g	+
<i>Klebsiella</i> spp.	A	A c/g	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A	A o A c/g	+
<i>Proteus mirabilis</i>	K	A o A c/g	+

Donde (*): solo en la parte superior de la punción o formación de una anillo; (A): Ácido; (K): Alcalino; (c/g): Con gas.

Si el tubo se inocula con un microorganismo fermentador de glucosa que no puede utilizar la lactosa, solo se puede obtener una cantidad relativamente pequeña de ácido a partir de una concentración de glucosa en el medio de 0.1%. Inicialmente, durante las primeras 8 a 12 horas de incubación, aun esa cantidad de ácido puede ser suficiente para convertir el color al amarillo tanto en la parte profunda como en la superficie inclinada. En las pocas horas siguientes, sin embargo, el suplemento de glucosa se agota en forma completa y la bacteria comienza la degradación oxidativa de aminoácidos dentro de la superficie inclinada del tubo, donde hay oxígeno. Esto resulta en la liberación de aminos que rápidamente contrarrestan las pequeñas cantidades de ácido presentes en la superficie inclinada; y entre las 18 y las 24 horas, la superficie inclinada completa revierte a un pH

alcalino y el color vuelve a ser rojo. En la porción profunda (anaerobia) del tubo, la degradación de aminoácidos es insuficiente para contrarrestar el ácido formado y el medio permanece amarillo. Por lo tanto, una reacción alcalina en la superficie inclinada y ácida en profundidad es un importante indicador inicial de un microorganismo prueba no fermentador de la lactosa (Koneman *et al.*, 2004).

3.4.2. Agar Lisina Hierro (LIA)

Muchas especies de bacterias poseen enzimas que pueden descarboxilan aminoácidos específicos en el medio de prueba. Las enzimas descarboxilasas remueven una molécula de CO₂ de un aminoácido para formar aminas reactivas alcalinas. Los aminoácidos más comúnmente probados son Lisina, Ornitina y Arginina que se convierten en las aminas Cadaverina, Putrescina y Citrulina respectivamente (Koneman *et al.*, 2004).

Edwards y Fife describieron un medio solido lisina descarboxilasa para la detección de sulfuro de hidrógeno basado en la fórmula de Falkow, el cual incluye citrato férrico de amonio y tiosulfato. Este medio es el agar lisina hierro (LIA), usado en muchos laboratorios como una ayuda en la identificación de especies de *Salmonella*, la mayoría de las cuales son tanto sulfuro de hidrógeno positivas como lisina descarboxilasa positivas. (Koneman *et al.*, 2004).

La decarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesario la fermentación previa de la glucosa. Los microorganismos que no decarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio. La formación de H₂S produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido. Un LIA con coloración negra en profundidad y una superficie inclinada purpura indica virtualmente especies de *Salmonella*. Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido α -acetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis (Caffer *et al.*, 2008).

Cuadro 6. Crecimiento de enterobacterias en LIA (Caffer *et al.*, 2008).

Bacteria	Estría	Punción	H ₂ S
<i>Salmonella</i> spp.	K	K	+
<i>Proteus mirabilis</i>	R	A	+
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	+
<i>Morganella morganii</i>	K	A	-
<i>Providencia rettgeri</i>	R	A	-
<i>Providencia</i> spp.	R	A	-
<i>Citrobacter</i> spp.	K	A	+
<i>Escherichia coli</i>	K	A	-
<i>Shigella</i> spp.	K	A	-
<i>Klebsiella</i> spp.	K	K	-

Donde (A): Alcalino; (K): Alcalino; (R): Desaminacion de Lisina

3.4.3. Agar Sulfito Indol Motilidad (SIM)

Es un medio que se usa para determinar la formación de sulfuro de hidrógeno, la producción de indol y la movilidad en el diagnóstico de Enterobacterias. Es positivo a la producción de H₂S cuando hay ennegrecimiento del medio, a la movilidad cuando hay turbidez difusa del medio y a la producción de indol cuando aparece un anillo color rojo al agregar el reactivo de kovaks (Caffer *et al.*, 2008).

Una característica importante para la identificación de ciertas especies de bacterias es su capacidad de liberar azufre a partir de aminoácidos que contienen azufre u otros compuestos en la forma de H₂S. Primero ocurre la liberación de sulfuro de la cisteína o el tiosulfato por la acción de enzimas bacterianas, luego se acopla el sulfuro (S²⁻) con el ion hidrógeno (H⁺) para formar H₂S, el cual es detectado por hierro peptonizado, bismuto o plomo que producen sulfuros de metales pesados (sulfitos) que aparecen como precipitados negros. Otra característica importante para hacer la identificación de especies es la movilidad bacteriana. Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización varían entre las diferentes especies. El medio para movilidad tiene una concentración de agar de 0.4% o menos. La prueba de movilidad se interpreta haciendo un examen macroscópico del medio para detectar una zona difusa de crecimiento que se proyecta sobre la línea de inoculación. Por último, el indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa pueden cribar el triptófano, y de este modo producir

indol, ácido pirúvico y amonio. El indol puede detectarse en un medio triptofano de prueba mediante la observación del desarrollo de color rojo después de agregar una solución que contiene *p*-dimetilaminobenzaldehído (Reactivo de Ehrlich o de Kovac) (Koneman *et al.*, 2004).

Cuadro 7. Crecimiento de enterobacterias en agar SIM (Caffer *et al.*, 2008).

Bacteria	H₂S	Indol	Movilidad
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Salmonella</i> spp.	+	-	+

3.4.4. Agar Citrato de Simmons

El principio de la prueba de utilización del citrato es determinar la capacidad de un microorganismo para usar citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento. La fórmula original, descrita por Koser en 1923, consistía en un caldo que contenía fosfato de sodio y citrato de sodio. Simmons agregó agar y azul de bromotimol a la fórmula de Koser, lo cual provee un punto final más sensible. El agar citrato de Simmons se vierte en un tubo de prueba y se inclina. Se estra un inóculo liviano de una colonia de crecimiento del microorganismo prueba sobre la superficie oblicua del agar. Si el inóculo es muy cargado, los compuestos orgánicos preformados dentro de las paredes celulares de bacterias moribundas pueden liberar suficiente carbono y nitrógeno para producir una prueba con resultado falso positivo. Cuando se inocula una serie de tubos de medio de cultivo diferencial con un microorganismo desconocido, es importante que el medio citrato sea estriado primero para prevenir el arrastre de proteínas o hidratos de carbono de otro medio (Koneman *et al.*, 2004).

La producción de color azul en el medio de prueba después de 24 horas de incubación a 35°C indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo de la prueba de utilización del citrato. Si se utiliza el carbón a partir del citrato de sodio, el nitrógeno se extrae del fosfato de amonio contenido en el medio, con lo cual se libera amonio. En ocasiones se detecta un crecimiento visible a lo largo de la estría antes de la conversión del medio al color azul. El crecimiento visible también indica una prueba de resultado positivo (Koneman *et al.*, 2004).

3.4.5. Agar Urea

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amonio y se produce un cambio de color rosado-rojo en el medio. Deben destacarse las diferencias importantes entre el caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen. El agar urea de Christensen es menos tamponado que el caldo urea de Stuart y contiene peptonas y glucosa. Este medio enriquecido soporta el crecimiento de muchas especies de bacterias que no pueden crecer en caldo de Stuart y la capacidad tampón disminuida permite la detección de pequeñas cantidades de amonio. Los microorganismos que producen menos ureasa, como ciertas especies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Brucella* y *Bordetella bronchiseptica*, pueden probarse con el agar urea de Christensen. Para muchas de estas especies, una reacción de ureasa positiva se detecta primero por un cambio de color rosado a rojo en la porción inclinada del agar. Al comienzo en la superficie inclinada se pone roja porque la reacción alcalina, que resulta de la dispersión de pequeñas cantidades de urea, aumenta por las aminas formadas provenientes de la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos en la región del medio expuesto al aire (Koneman *et al.*, 2004).

3.5. Identificación de *Salmonella* spp. mediante Serotipificación

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permita determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, como así también es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión (Caffer *et al.*, 2008). Se ha establecido la prueba serológica de antígeno polivalente somático (O) y antígeno polivalente flagelar (H) como pruebas confirmatorias que deben ser llevadas a cabo después de las pruebas bioquímicas, luego se procederán con las pruebas de antígeno somático (O) específicas para cada grupo (ISO, 2002; FDA, 2007)

El uso de reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aun entre grupos de microorganismos relacionados. Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos: componentes estructurales de la célula (pared, capsula, fimbrias) y productos de excreción (exotoxinas, enzimas extracelulares). La base de la

serotipificación para todas las enterobacterias es similar: se pone en evidencia la presencia de antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi), cuya asociación particular determina una serovariedad específica (Caffer *et al.*, 2008).

La primera clasificación de serovariedades basada en estos antígenos superficiales (somáticos y flagelares, principalmente) fue propuesta por White en 1926. Este esquema fue modificado por Kauffmann en 1941 y actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) así como los laboratorios de referencia se basan en el denominado esquema de Kauffmann-White para la clasificación de las serovariedades de *Salmonella* (García, 2011).

3.5.1. Antígeno somático (O):

Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) que se encuentra en todos los microorganismos Gram negativos, la naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. La estructura somática se denomina con la letra O seguida de números arábigos separados por comas, que corresponden a sus factores. Por ejemplo, *S. Typhimurium* O:1,4,5,12 (Caffer *et al.*, 2008).

Los Antígenos somáticos se clasifican en mayores y menores. Los antígenos somáticos mayores son aquellos que definen el serogrupo o grupo antigénico y son compartidos por todas las salmonelas incluidas en un mismo serogrupo. Así, el antígeno somático O:4 caracteriza al serogrupo que se denominaba B y que actualmente se denomina serogrupo O:4. Por su parte, los antígenos somáticos menores tienen un menor valor discriminativo puesto que son compartidos por *Salmonellas* de diferentes serogrupos. Por ejemplo, el antígeno somático O:12 se detecta en *Salmonellas* de los serogrupos A, B y D. Además, algunos antígenos menores son generados por modificaciones químicas de un antígeno mayor o por conversiones fágicas (García, 2011).

3.5.2. Antígeno flagelar (H):

El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (“hook”) y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el “hook” une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento, este está

constituido por flagelina. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido de aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina. La mayor parte de las cepas de *Salmonella* son capaces de expresar alternativamente dos flagelinas antigénicamente diferentes, denominadas de fase 1 o específica, característica del serotipo, y de fase 2 o no específica, que pueden ser comunes a otros serotipos (Ejem. *S. Typhimurium*). No obstante, existen aislados denominados monofásicos que expresan solo una de las dos flagelinas (*S. Enteritidis*) (Caffer *et al.*, 2008; García, 2011).

3.5.3. Antígeno capsular (Vi)

Entre los antígenos capsulares de las Enterobacterias, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*. Se encuentra en solo tres serovares: *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y en algunas cepas *S. Dublin* (Caffer *et al.*, 2008).

3.5.4. Esquema de Kauffmann – White

Sobre la base de los componentes antigénicos somáticos O y flagelares H se ha establecido lo que se denomina el Esquema de Kauffmann-White, que agrupa a todas las serovariedades conocidas. El mismo comprende la primera columna que indica el nombre de la serovariedad, si la misma pertenece a *S. enterica* subesp. *enterica* (I) ó las siglas *S. II*, *S. IIIa*, *S. IIIb*, *S. IV*, *S. V*, *S. VI*; indicando que la serovariedad considerada pertenece a la subespecie II ó III a, etc; en tanto la segunda columna corresponde a los antígenos somáticos (O). Los números indican los factores del antígeno O y se escriben, separados por una coma. Las serovariedades son agrupadas en grupos somáticos, cada uno de ellos caracterizado por un factor O mayor. Así se determinan los grupos A, B, C, etc. Por ej. el grupo O:2 (A) está integrado por *S. Paratyphi A* (1,2,12:a:-) entre otras, el grupo O:4 (B) por *S. Typhimurium* (1,4,5,12:i:1,2); *S. Agona* (1,4,12:f,g,s:-); *S. Saintpaul* (1,4,5,12:e,h:1,2), entre otras, etc. El Esquema de Kauffmann-White presenta 67 grupos O, desde el grupo A hasta el Z y luego continúa con números, desde el O:51 hasta el O:67. Finalmente la tercera y cuarta columna corresponde a los antígenos flagelares (H). Se indican los factores de las fases 1 y 2, del antígeno H, respectivamente. Para la fase 1 los factores se denominan con letras minúsculas, seguidas algunas veces por un número que figura como subíndice y para la fase 2 se emplean en general números arábigos, aunque

también se utilizan letras minúsculas. Un signo "negativo" indica que la fase considerada está ausente y por lo tanto la serovariedad es monofásica (Caffer *et al.*, 2008).

Ejemplos:

- *Salmonella* Enteritidis: 1,9,12:g,m:- [Ag O 1, 9,12; Ag H (fase 1) g,m; Ag H (fase 2) es -; la fase 2 está ausente, por lo tanto la serovariedad es monofásica].
- *Salmonella* Typhimurium: 1,4,5,12:i:1,2 [Ag O 1,4,5,12 ; Ag H (fase 1) i ; Ag H (fase 2) 1,2; las dos fases flagelares están presentes, por lo tanto la serovariedad es difásica].

4. Detección molecular de *Salmonella* spp.

Las técnicas moleculares son a menudo rápidas y bastante discriminatorias, estas están remplazando los métodos fenotípicos, como el serotipificado y fagotipificado, para la investigación epidemiológica en algunos laboratorios. Las técnicas genéticas como micro-array y PCR múltiple dirigidas a identificar serotipos específicos así como proveer información adicional en virulencia y resistencia antimicrobiana, han sido desarrolladas pero aún no están totalmente validadas para un diagnóstico de rutina (OIE, 2010).

Las experiencias de las dos últimas décadas indican que las técnicas de la PCR finalmente sustituirán a muchos de los métodos directos clásicos de detección de agentes infecciosos. Está claro que la PCR está reemplazando el aislamiento de virus o el cultivo de bacterias para la detección de agentes que son difíciles o imposibles de cultivar. Aunque los ensayos de la PCR inicialmente eran caros y engorrosos, hoy en día son herramientas relativamente baratas, seguras y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico. Generalmente, la sensibilidad y la especificidad de la PCR son mayores que los procedimientos ELISA de captura del antígeno (OIE, 2008)

La PCR es una metodología, resultante de la aplicación práctica de tres procesos, desnaturalización, hibridación y replicación (elongación), mediante cuya repetición se consigue un número muy alto de copias de fragmento de ácido nucleico en un corto espacio de tiempo; todo esto requiere un control preciso de las variables que condicionan este triple proceso, además de equipos adecuados para establecer con precisión las condiciones de cada etapa y repetirlas cíclicamente (Herráez y Luque, 2012).

4.1. Componentes de la PCR

4.1.1. ADN Polimerasa

La polimerasa termoestable del ADN es extraída de organismos termófilos e hipertermofilos como *Thermus aquaticus*. Es enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (75°C promedio). La replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente desemparejados y contribuye así a la especificidad y rendimiento del proceso. Por otra parte, la estabilidad de la polimerasa a temperaturas de hasta 95°C permite que recupere su actividad al enfriarse de nuevo y evita así la necesidad de reponer la enzima en sucesivos ciclos (Sambrook y Russell, 2001; Herráez y Luque, 2012).

4.1.2. Oligonucleótidos cebadores

Son monocatenarios, formados por 18 a 30 nucleótidos. Sus secuencias han de ser complementarias, respectivamente, a los dos extremos 3' de la región diana, uno en cada hebra, de modo que los oligonucleótidos puedan ejercer de cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana, además deben tener una distribución balanceada de residuos de G y C, y una baja propensión a formar estructuras secundarias estables (Sambrook y Russell, 2001; Herráez y Luque, 2012).

4.1.3. dNTP

Los PCR comúnmente contienen cantidades equimolares de dATP, dTTP, dCTP y dGTP, como sustratos para la síntesis de las innumerables copias de ADN. Para ser reconocidos por la polimerasa, deben ir acompañados de Mg^{2+} que es, además, una coenzima requerida por la polimerasa; se debe tener cuidado con las altas concentraciones de dNTPs ya que pueden secuestrar el Mg^{2+} e inhibir la PCR (Sambrook y Russell, 2001; Herráez y Luque, 2012).

4.1.4. Cationes divalentes

Todas las ADN polimerasas requieren de cationes divalentes libres, usualmente Mg^{2+} , para su actividad. Los dNTPs y los oligonucleótidos se unen a Mg^{2+} , por lo que la concentración molar del catión debe superar la concentración molar de los grupos fosfato (dNTPs más cebadores). Los agentes quelantes como el EDTA pueden secuestrar Mg^{2+} (Sambrook y Russell, 2001).

4.1.5. Buffer

Tris-Cl, ajustado a un pH entre 8.3 a 8.8, es incluido en la PCR a la concentración de 10 mM (Sambrook y Russell, 2001).

4.1.6. ADN molde

El molde puede ser un fragmento de ADN, una preparación genómica de ADN, un plásmido recombinante o un bacteriófago, o cualquier otra muestra que contenga ADN. El ADN molde se disuelve en 10 mM Tris-Cl (pH 7.6) que contenga una baja concentración de EDTA (<0.1 mM). Cuando se amplifican ADN pesado de más de 10 kb, se puede utilizar la digestión por enzimas de restricción (Sambrook y Russell, 2001).

4.2. Etapas de la PCR

Se requiere una sucesión de ciclos que son en general entre 20 y 40, de 1.5 a 5 minutos de duración cada uno, formados por desnaturalización, hibridación y elongación, para conseguir una enorme amplificación del número de moléculas que contienen la secuencia de interés (Herráez y Luque, 2012).

4.2.1. Desnaturalización

Calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (30-120 s) a una temperatura comprendida entre 68 y 97°C, que debe ser superior a la de fusión (T_m) de la región de ADN que quiere amplificarse; la temperatura de la desnaturalización es directamente proporcional al contenido de G y C debido a la naturaleza de sus enlaces, se prefiere un contenido de G y C de hasta 55% (Sambrook y Russell, 2001; Herráez y Luque, 2012).

4.2.2. Hibridación

Es el enfriamiento rápido por debajo de T_m (usualmente 3 – 5 °C) de forma que se permite el emparejamiento del ADN monocatenario de interés con los cebadores, la temperatura es crítica ya que de ella depende la calidad de amplificación del ADN. En general se usan temperaturas comprendidas entre 37 y 65°C que se mantienen entre 10 y 120 s (Sambrook y Russell, 2001; Herráez y Luque, 2012).

4.2.3. Elongación

Etapa de amplificación propiamente dicha (72 – 75 °C, 1-3 min), en la que la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación ocurre en dirección 5' – 3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTP, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se eleve la temperatura en una nueva etapa de desnaturalización. La tasa de polimerización de la *Taq* polimerasa es 2000 nucleótidos/minuto a una temperatura óptima y como regla general, la extensión debe durar 1 minuto por cada 1000 pb del producto (Herráez y Luque, 2012).

4.3. La PCR múltiple

Se usa este término cuando más de un par de cebadores es usado en la reacción en cadena de la polimerasa. El objetivo de la PCR múltiple es amplificar varios segmentos del ADN blanco simultáneamente y por lo tanto conservar el ADN molde, ahorrar tiempo y minimizar el gasto. El rendimiento de cada producto amplificado es reducido en proporción al número de par de cebadores incluido en la reacción. Lamentablemente la PCR múltiple es muy difícil de establecer. Se tiene que tener cuidado para asegurar que todos los cebadores en la reacción tengan aproximadamente la misma temperatura de fusión, que los cebadores no interactúen entre ellos, y que los productos amplificados tengan aproximadamente el mismo tamaño pero que puedan ser distinguidos unos de los otros en el gel de electroforesis (Sambrook y Russell, 2001).

4.4. Protocolos para la detección de *Salmonella* spp. mediante PCR

En 1992, Rahn *et al.*, estableció un protocolo de PCR para detectar *Salmonella* spp. mediante la amplificación de una secuencia de nucleótidos del gen *InvA*, con un peso molecular de 284 pb, este gen es esencial para la invasión de *Salmonella* a las células epiteliales con una sensibilidad de 99.4% y un límite de detección de 300 células, el cual es más sensible que el ELISA y la inmunofluorescencia; este protocolo de PCR fue posteriormente validado mediante ensayos interlaboratorios y actualmente se utiliza como prueba tamizaje para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos (Malorny *et al.*, 2003; WHO, 2010).

Por otro lado también se utiliza para la detección de *Salmonella* spp. el gen *hlyA*, el cual codifica la Isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1) y se ha demostrado

especifico en la PCR convencional pero poco sensible cuando se utiliza para el diagnóstico de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* mediante PCR múltiple (Pathmanathan *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2008).

En tanto para la detección específica de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis se desarrolló con cierto éxito un protocolo de PCR múltiple para amplificar a la vez fragmentos de 429 pb dentro de una secuencia clonada aleatoriamente específica para el género de *Salmonella*, fragmentos de 559 pb dentro del gen *fliC* que codifica la flagelina H1 específico de *Salmonella* Typhimurium y fragmentos de 312 pb dentro del gen *sefA* que codifica un antígeno fimbrial específico de *Salmonella* Enteritidis y otros serotipos del serogrupo D (Soumet *et al.*, 1999). Por otro lado se determinó que el gen *Prot6E* que codifica la biosíntesis fimbrial, está relacionado a la sobrevivencia de *S. Enteritidis* en albumina de huevo y es específica de este serovar, validado y aplicado en la detección de *S. Enteritidis* mediante PCR en tiempo real (Clavijo *et al.*, 2006; Malorny *et al.*, 2007).

Finalmente, Jamshidi *et al.*, en el 2010 desarrolla un protocolo de PCR múltiple para detectar *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en huevos, mediante la amplificación simultanea de fragmentos de 284 pb del gen *InvA* específico para el género *Salmonella*, fragmentos de 559 pb del gen *fliC* específico para el serovar Typhimurium y fragmentos de 185 pb del gen *Prot6E* específico para el serovar Enteritidis.

5. Otros métodos de detección de *Salmonella* spp.

5.1. Métodos rápidos

Como métodos alternativos se puede identificar *Salmonella* spp. por test de aglutinación en portaobjeto usando suero polivalente para *Salmonella*, adicionalmente es necesario usar test bioquímicos para confirmar la identidad, se puede usar API (Analytical Profile Index) o sistemas automatizados como el Vitek (BioMérieux) con tiempos de identificación estimados entre 4 y 18 horas, también la prueba de OBIS o medios compuestos como TSI, como pruebas de primera mano para *Salmonella*. Adicionalmente se pueden utilizar pruebas bioquímicas especiales como la fermentación de d-tartrato, y la sensibilidad a antimicrobianos, cuya importancia está aumentando debido a la aparición de nuevas cepas multirresistentes a cefalosporinas y fluorquinolonas (OIE, 2010; García, 2011).

5.2. Método de Fagotipificación

Los fagos son virus que infectan a las bacterias produciendo, en la mayor parte de los casos, su destrucción y, consecuentemente, zonas de lisis visibles a simple vista sobre placas de agar en las que se ha sembrado previamente la bacteria (Garcia, 2011)

Debido a su alta especificidad, cada fago es capaz de infectar solamente a una cepa determinada de una bacteria o a cepas muy similares, que se incluyen en un mismo grupo denominado fagotipo. Esta especificidad, en el caso *Salmonella*, se ha aprovechado para tipificar las cepas en función de que sean receptivas a la lisis por uno u otro fago. El fagotipo o lisotipo es de gran valor en el estudio epidemiológico o de *Salmonella*, ya que existe un alto grado de correlación entre fagotipo y origen epidémico (Rabsch *et al.*, 2002).

Entre los inconvenientes de este método figura por un lado que es una técnica muy laboriosa, que requiere una amplia batería de fagos que no suelen comercializarse y cuyo acceso suele limitarse a los laboratorios de referencia. Por otro lado, no todos los aislados pueden ser caracterizados y existen diferentes mecanismos que pueden provocar un cambio en el fagotipo (Garcia, 2011).

5.3. Métodos genotípicos

Los métodos de tipificación genotípica permiten distinguir diferencias genómicas mínimas, que no tienen una manifestación fenotípica y que no son observables por otros métodos. En general, los métodos de tipificación genotípica tienen un mayor poder de discriminación que los métodos de caracterización fenotípica y son relativamente reproducibles (Garcia, 2011).

Entre los métodos de tipificación molecular más usados están el perfil plasmídico, el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mediante electroforesis de campo constante (“restriction fragment length polymorphisms” o RFLP) o en campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis” o PFGE), el revelado de fragmentos específicos mediante hibridación con sondas genéricas (como por ejemplo la ribotipificación y perfiles de secuencias de inserción) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (“random amplification of polymorphic DNA” o RAPD) o la detección de polimorfismos en las secuencias repetidas en tandem (“multi locus variable-number

tandem repeat analyses” o MLVA), siendo la PFGE la técnica más utilizada para la tipificación molecular en los laboratorios de referencia de *Salmonella* de los diferentes países miembros de la UE seguida de la técnica de MLVA (EFSA, 2009).

5.4. Métodos inmunológicos

Entre las técnicas inmunológicas utilizadas para la detección directa de *Salmonella* destacan los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Las técnicas ELISA utilizadas para la detección directa de *Salmonella* se basan en el tapizado de las placas con anticuerpos frente a diferentes antígenos flagelares y somáticos de *Salmonella*. La lectura de los resultados se realiza mediante un espectrofotómetro siendo esta lectura proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. En cuanto más limpia sea la muestra mayor es la eficacia de la técnica (Garcia, 2011).

Por el contrario, entre sus inconvenientes destaca el hecho de que continua siendo necesaria una etapa de pre-enriquecimiento o enriquecimiento selectivo ya que su límite de detección se sitúa entre 10^3 y 10^5 UFC por ml, por lo que para la realización de la prueba necesitaríamos entre 24 y 48 horas (Blackburn, 1993).

En aves de producción, la prueba de sangre entera, que usa un antígeno teñido y la prueba de aglutinación en suero (SAT) son usadas para detectar *S. Pullorum/Gallinarum*, desde hace mucho tiempo. Por otro lado se han desarrollado ELISAs para el diagnóstico de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aves de corral y otros animales de granja, *S. Dublin* en leche de ganado vacuno, *Salmonella* spp. en suero o secreciones de musculo de cerdo, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de yema de huevo de ponedoras comerciales; muchos de ellos son de uso rutinario y están disponibles comercialmente, pero ciertas pruebas aun necesitan ser estandarizadas para su uso (OIE, 2010).

Por lo general los ELISAs utilizados para la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* están basados en el uso de antígenos somáticos o antígenos O y son los conocidos como LPS-ELISA. La respuesta inmunitaria es específica para cada antígeno O, lo que permite identificar animales infectados por los diferentes serotipos de *Salmonella* incluidos en un mismo serogrupo que comparte antígenos somáticos mayores. Los ELISAs que utilizan mezclas de antígenos somáticos de diferentes serogrupos para el tapizado de las placas se denominan Mix-LPS-ELISAs (Garcia, 2011).

Los ELISAs son de utilidad para la detección de animales que han estado en contacto con la bacteria y que pueden ser eliminadores intermitentes o portadores latentes, lo mismo que animales que recibieron terapia antimicrobiana previa, que en el momento del muestreo no estén excretando la bacteria y, por tanto, animales que no se detectarían por análisis bacteriológico. Como limitante, existen más de 2500 serovares de *Salmonella*, por lo que hay que considerar la reacción cruzada entre dos diferentes serovares, además de no poder distinguir la respuesta inmune causada por una vacuna o por la cepa de campo (OIE, 2010; García, 2011).

6. Desempeño de la PCR respecto a otros métodos de detección de *Salmonella* spp.

La PCR muestra distinto desempeño para la detección de *Salmonella* spp. dependiendo de la etapa del método microbiológico convencional en la que es llevada a cabo, pero es superior en la mayoría de ocasiones respecto a otros métodos de detección.

Para detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces en pre-enriquecimiento, la PCR en comparación con la detección microbiológica muestra mejor desempeño (Feder *et al.*, 2001), llegando en algunos casos a detectar *Salmonella* spp. cuando el método microbiológico convencional no pudo (Ahmadi *et al.*, 2010), el rendimiento de la PCR mejora mas aún si se lleva a cabo a partir de enriquecimiento selectivo con MSRV (Medio Rappaport Vassiliadis Semi-Solido) (Eriksson y Aspan., 2007; Soria *et al.*, 2011).

En cuanto a muestras de alimentos, la PCR a partir de pre-enriquecimiento muestra ser más sensible y rápida que el método convencional (Ferraz-Castagna *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Por otro lado la PCR llevada a cabo directamente de muestras sin pre-enriquecimiento también resulto ser efectiva para detectar *Salmonella* spp. en algunas muestras de hígado de pollo artificialmente contaminado, con un límite de detección de 175 UFC/ml (Ocepek *et al.*, 2006), en contraste a muestras de hisopados de carcasas de pollo donde no se logró detectar *Salmonella* spp. mediante PCR directamente de la muestra (Matias *et al.*, 2010).

Finalmente la PCR a partir de pre-enriquecimiento resulto tener mayor sensibilidad y mejor desempeño para la detección de *Salmonella* spp. que el ELISA de captura de antígeno, en muestras de heces y alimentos (Eriksson y Aspan, 2007; Kumar *et al.*, 2007). Mientras que en comparación entre técnicas moleculares de q-PCR, RT q-PCR y LAMP

(Loop mediated isothermal amplification) el rendimiento resulto ser similar entre ellas, pero la RT q-PCR resulto ser mejor al discriminar entre organismos viables y no viables de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos (Zhang *et al.*, 2011).

III. MATERIALES Y METODOS

1. Lugar y Tiempo

La toma de muestras se llevó a cabo en 2 lugares: Unidad de Cuyes de la Estación Experimental “El Mantaro” del Instituto Veterinario de Investigaciones de Trópico y Altura, ubicada en el Km 34 de la carretera central Huancayo-Jauja (Distrito El Mantaro, Provincia Jauja, Departamento Junín) a una altura de 3320 m.s.n.m., y la Asociación de criadores de cuyes “Pachacuy” ubicada en el Asentamiento Humano “Pampa libre” (Distrito Chancay, Provincia Huaral, Departamento de Lima) a una altura de 43 m.s.n.m., ejecutándose en los meses de Octubre a Diciembre del 2015, y Enero a Febrero del 2016.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en la Unidad de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de Octubre del 2015 a Abril del 2016.

2. Material y Diseño experimental

El material experimental consistió de 111 cobayos de crianza comercial (13 del IVITA “El Mantaro” y 98 de la ASCRICUY “Pachacuy”), de 1 día hasta 20 meses de edad.

El criterio de selección de los cobayos materia de este trabajo, fue el haber muerto con signos clínicos de depresión, pelaje hirsuto, anorexia, caquexia, deshidratación, diarrea y postración (uni o bilateral), que desencadenaban en muerte súbita, lo cual es compatibles con un diagnóstico presuntivo de Salmonelosis (Chauca, 1997).

3. Metodología

3.1. Toma de muestras

Se realizó la colección del espécimen entero en el lugar de procedencia (Chancay y El Mantaro) para luego realizar la necropsia y toma de muestra dentro de las 24 horas post-mortem del espécimen en el laboratorio, conservándolo en cadena de frío a 4°C durante todo el proceso de transporte, según indica el manual de procedimiento: recolección y envío de especímenes/muestras, y exámenes solicitados al laboratorio de SENASA (SENASA, 2014).

La muestra fue tomada de parénquima hepático, ya que según reportes anteriores (Matsuura, 2008; Layme, 2009) es el órgano que presenta mayor frecuencia de lesiones y aislamientos microbiológicos de *Salmonella* spp. en cuadros de salmonelosis.

3.2. Procesamiento de muestras

Las muestras fueron analizadas en simultáneo siguiendo las dos vías (Análisis microbiológico y PCR Múltiple) a partir del pre-enriquecimiento no selectivo, tal como se observa en la **Figura 2**.

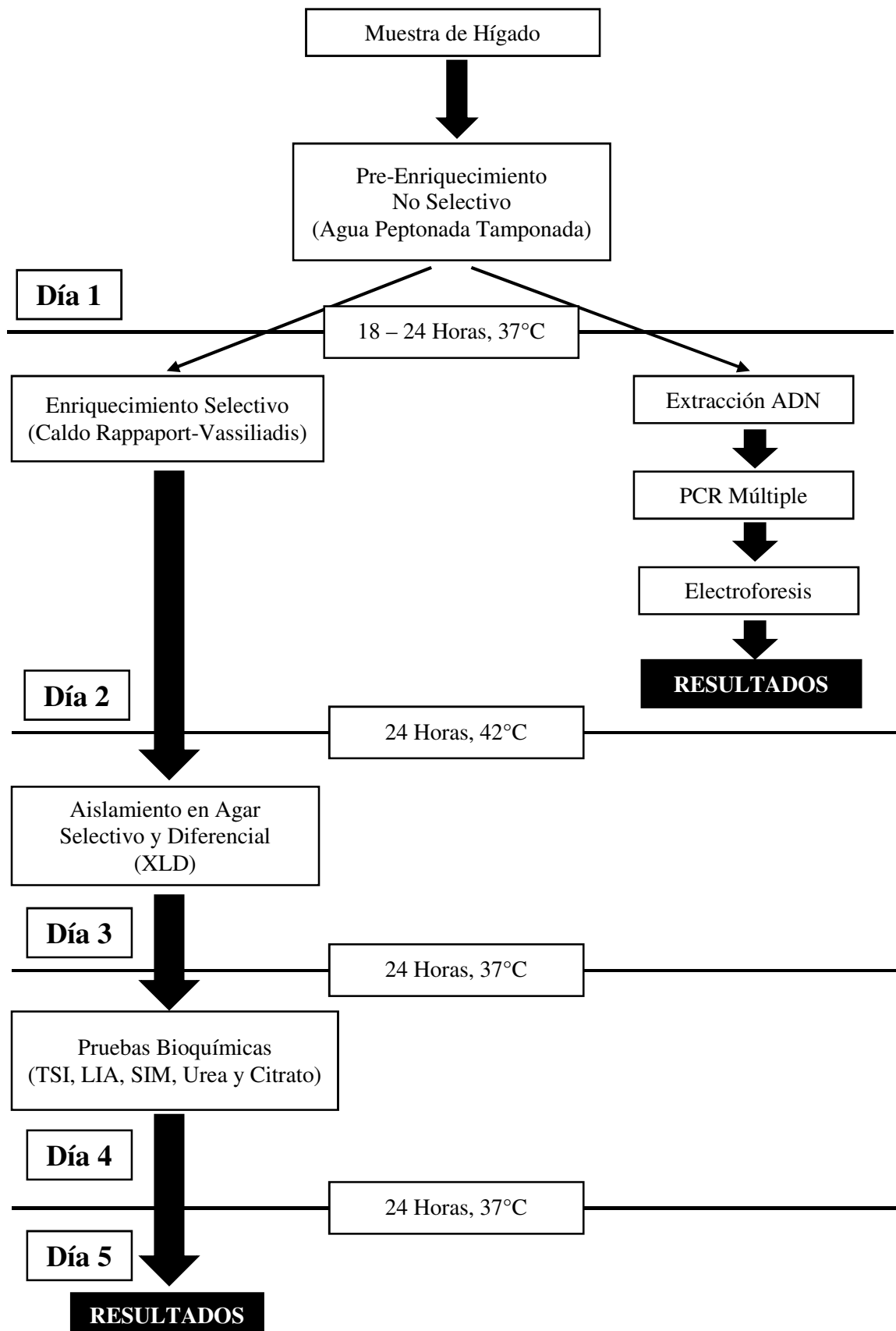
3.2.1. Análisis microbiológico

Adaptado de la norma ISO-6579:2002 (ISO, 2002) y el Bacteriological Analytical Manual: Salmonella 5° Ed (FDA, 2007).

3.2.1.1. Pre-enriquecimiento no selectivo

Se colocó 1 parte de la muestra (parénquima hepático) en 9 partes de agua peptonada tamponada (APT), se incubó a 37°C durante la noche (18 horas), al término se tomó 1 ml de este caldo para la extracción de ADN y posterior análisis por PCR múltiple, cuyo protocolo se detalla más adelante.

Figura 2. Diagrama de flujo del procesamiento de muestras para detección de *Salmonella* spp. mediante análisis microbiológico y análisis molecular



3.2.1.2. Enriquecimiento selectivo

Al día siguiente, se tomó 1 parte del medio de Pre-enriquecimiento en 9 partes de medio Rappaport-Vassiliadis (RV), se incubó a 42°C por 24 horas.

3.2.1.3. Aislamiento en agar selectivo y diferencial

Al día siguiente, se homogenizó el medio RV y sembró por agotamiento en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), se incubó a 37°C por 24 horas.

3.2.1.4. Caracterización bioquímica

Al día siguiente, dos colonias sospechosas se subcultivaron por agotamiento en agar XLD y a la vez también se sometieron a las pruebas bioquímicas enlistadas en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Perfil bioquímico para detectar *Salmonella* spp.

Prueba Bioquímica	Estría	Punción	H ₂ S	Indol	Movilidad
TSI	K	A	+	*	*
LIA	K	K	+	*	*
SIM	*	*	+	-	+
Citrato	+	*	*	*	*
Urea	-	*	*	*	*

Donde K: Alcalino; A: Acido; (+): Positivo; (-): Negativo; (*): No se evalúa

Se incubaron las placas y la batería de bioquímicas a 37°C por 18-24 horas, los aislados que produjeron los cambios en las pruebas bioquímicas mencionados en el **Cuadro 8**, se consideraron como muestra positiva a *Salmonella* spp.

3.2.2. Análisis molecular

La identificación molecular se hizo a partir del ADN extraído de 1 ml del caldo de pre-enriquecimiento no selectivo (Agua Peptonada Tamponada) incubado por 24 horas en la primera etapa del análisis microbiológico, ya que los estudios previos (Matias *et al*, 2010; Mainar-Jaime *et al* 2013) sugieren el pre-enriquecimiento para aumentar la sensibilidad de la PCR. Como controles positivos se utilizaron las cepas ATCC *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) y *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076).

3.2.2.1. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN con el kit “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” de Thermo Scientific™, según indicaciones del fabricante para bacterias Gram negativas, siguiendo los pasos de lisis nucleica, degradación de RNA, precipitación proteica, lavado con alcoholes y rehidratación del ADN (Thermo Fisher Scientific, 2014).

3.2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó una PCR múltiple con los siguientes cebadores que muestra el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Cebadores utilizados en la PCR Múltiple (Jamshidi *et al.*, 2010)

Gen	Cebador	Secuencia Cebador 5' – 3'	Producto (bp)	Referencia
<i>invA</i>	S139-F	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284	Rahn <i>et al.</i> (1992)
	S141-R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>fliC</i>	Fli15-F	CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT	559	Soumet <i>et al.</i> (1999)
	Tym-R	ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT		
<i>Prot6E</i>	Prot6e-5-F	ATATCGTCGTTGCTGCTTCC	185	Clavijo <i>et al.</i> (2006)
	Prot6e-6-R	CATTGTTCCACCGTCACTTTG		

La PCR múltiple se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl con los reactivos en concentraciones que muestra el **Cuadro 10**, se realizaron algunas modificaciones en base a lo utilizado por Marcelo (2015), optimizando las concentraciones debido a la extracción directa del caldo APT.

Cuadro 10. Reactivos para la mezcla de la PCR Múltiple

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Inicial
Buffer	10 x	1 x	2 µl
MgCl ₂	100 mM	2 mM	0.4 µl
dNTP's	10 mM	1 mM	2 µl
Primer Mix	10 µM	1 µM	2 µl
Taq Polimerasa	5 U	1 U	0.2 µl
ADN			3 µl
H ₂ O			10.4 µl
TOTAL			20 µl

Se utilizaron las condiciones para la PCR múltiple estandarizadas por Marcelo (2015) tal como se aprecia en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11. Condiciones para la PCR Múltiple (Marcelo, 2015)

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	45 seg	35
Hibridación	58°C	45 seg	
Elongación	72°C	45 seg	
Elongación final	72°C	7 min	1

3.2.2.3. Electroforesis

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis usando un gel de agarosa al 2%, un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA *ladder*, New England Bio Labs Inc.) y TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5X como buffer de corrida, a 100V por 2 horas.

3.2.2.4. Visualización de bandas

Se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (1 µg/ml) por 20 segundos y se decoloró en agua destilada por 30 minutos para finalmente visualizar las bandas mediante el transiluminador UV. Cuando se detectó *Salmonella* spp. en las muestras, se visualizaron bandas de 284 pb de peso molecular correspondiente al gen *InvA*, mientras que cuando lo fueron a *Salmonella* Typhimurium se obtuvieron bandas de 284 pb y 559 pb de peso molecular, correspondientes a los genes *InvA* y *fliC* respectivamente, y cuando lo fueron a *Salmonella* Enteritidis se obtuvieron bandas de 284 pb y 185 pb de peso molecular, correspondientes a los genes *InvA* y *Prot6E* respectivamente (**Cuadro 12**).

Cuadro 12. Interpretación de resultados de la PCR Múltiple para *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis

Resultado	Gen		
	<i>InvA</i> (284 pb)	<i>fliC</i> (559 pb)	<i>Prot6E</i> (185 pb)
<i>Salmonella</i> spp.	+	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	+	-	+

Donde (+): Producto amplificado; (-): Producto no amplificado

4. Análisis de datos

Los resultados fueron analizados a partir de una tabla de contingencia 2 x 2 (**Cuadro 13**), para determinar el grado de concordancia entre los dos métodos empleados se usó la prueba de Kappa y para determinar si los resultados son estadísticamente similares se usó la prueba de Mc Nemar (González y Falcón, 1999).

Cuadro 13. Tabla de Contingencia

		ANALISIS MICROBIOLOGICO		
		Positivo	Negativo	TOTAL
PCR	Positivo	a	b	n ₁
MULTIPLE	Negativo	c	d	n ₂
TOTAL		f ₁	f ₂	N

Se calculó el grado de concordancia de los dos métodos mediante el índice de kappa, con la fórmula:

$$K = \frac{N(a+d) - (n_1 f_1 + n_2 f_2)}{N^2 - (n_1 f_1 + n_2 f_2)}$$

Una vez obtenido el valor de Kappa (K), se estableció el grado de concordancia según Landis y Koch, 1977, tal como se ve en el **Cuadro 14**.

Cuadro 14. Grados de concordancia para Kappa (Landis y Koch, 1977)

Valor de K	Grado de Concordancia
< 0	Muy Pobre
0 – 0.20	Ligera
0.21 – 0.40	Regular
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Substancial
0.81 – 1.00	Perfecta

Finalmente se determinó si los resultados de los métodos son estadísticamente similares mediante la prueba de Mc Nemar, según formula:

$$X^2_{Mc} = \frac{(b - c)^2}{b + c}$$

El estadístico calculado se compara con un valor tabular de Chi Cuadrado utilizando un grado de libertad y al nivel de significancia del 5 %:

$$X^2_{Mt} = 3.84$$

Donde sí:

$X^2_{Mc} < X^2_{Mt}$ = Los resultados de las pruebas son estadísticamente similares

$X^2_{Mc} > X^2_{Mt}$ = Los resultados de las pruebas son estadísticamente diferentes

IV. RESULTADOS

Fueron analizadas 111 muestras de parénquima hepático de cobayos con diagnóstico presuntivo de salmonelosis, mediante el Análisis microbiológico y paralelamente PCR múltiple a partir del pre-enriquecimiento no selectivo. Mediante el Análisis microbiológico se detectaron 45 animales positivos a *Salmonella* spp. (41%) y mediante la PCR múltiple se detectaron 60 animales positivos a *Salmonella* Typhimurium (54%).

Los resultados de detección de *Salmonella* spp. mediante el análisis microbiológico y la PCR múltiple se distribuyeron en una tabla de contingencia como se aprecia en el **Cuadro 15**. El producto de la PCR en el gel electroforesis se observa en la **Figura 3**.

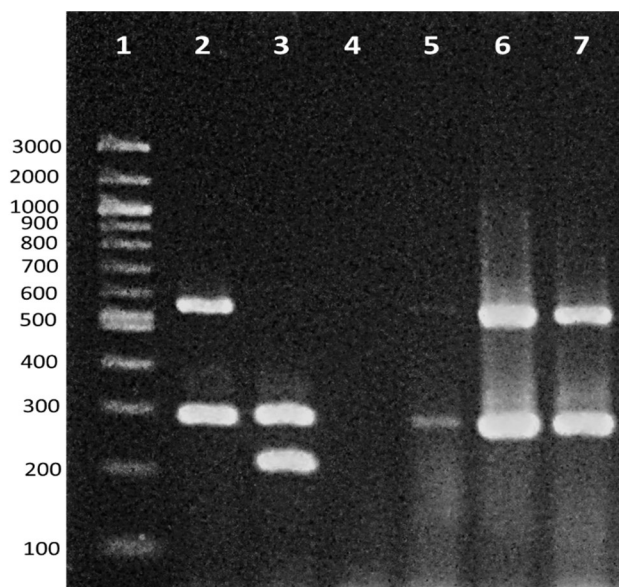


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de la PCR Múltiple para *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis. Carril 1: Marcador molecular 100 pb. Carril 2: Control positivo (*Salmonella* Typhimurium – ATCC 14028). Carril 3: Control positivo (*Salmonella* Enteritidis – ATCC 13076). Carril 4: Control Negativo (Agua Ultrapura). Carril 5 – 7: Muestras positivas a *Salmonella* Typhimurium.

Cuadro 15. Resultados de detección de *Salmonella* mediante Análisis microbiológico y PCR múltiple distribuidos en tabla de contingencia 2 x 2

		ANALISIS		
		MICROBIOLOGICO		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
ANALISIS MOLECULAR	POSITIVO	44	16	60
	NEGATIVO	1	50	51
TOTAL		45	66	111

De los resultados del cuadro de contingencia se obtuvo el índice de Kappa para determinar el grado de concordancia siendo el $K = 0.64$, lo que indica un grado de concordancia substancial (**Cuadro 14**).

Por otro lado, mediante la prueba de Mc Nemar se obtuvo un $X^2_{Mc} = 9.8$, que fue comparado con el valor tabular de Chi Cuadrado con un grado de libertad y significancia de 5 %, $X^2_{Mt} = 3.84$, siendo el $X^2_{Mc} > X^2_{Mt}$, por lo tanto los resultados de ambos métodos fueron estadísticamente diferentes y no se pueden reemplazar mutuamente.

V. DISCUSION

Dentro de las causas de pérdida económica en la producción de cuyes esta la salmonelosis que puede representar del 61% al 95% de mortalidad en una población de cuyes (Ramirez, 1972; Chauca, 1997; Matsuura, 2008). La importancia de esta enfermedad radica en una alta mortalidad y morbilidad, lo que conlleva a muchas muertes en corto tiempo, y disminuye la productividad de la crianza desalentando la mayor inversión del productor en esta actividad pecuaria (Chauca, 2007), por ello la detección oportuna de sus agentes etiológicos es crucial para poder combatir esta enfermedad.

La detección de *Salmonella* spp. puede realizarse por diversos métodos de los cuales la PCR y el análisis microbiológico son de relevante importancia (OIE, 2010; García, 2011), siendo el ultimo el “Gold estándar” en los laboratorios de referencia, con un protocolo que incluye el pre-enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, aislamiento en agar diferencial y confirmación por pruebas bioquímicas y serotipificación (ISO, 2002; FDA, 2007; OIE, 2010); este método es sumamente importante ya que nos permite además del diagnóstico de la enfermedad, la manipulación de la cepa para pruebas de sensibilidad antimicrobiana o la conservación de esta para posteriores estudios, teniendo como principal desventaja la baja sensibilidad y el tiempo que toma de 4 a 5 días o más para confirmar los resultados (ISO, 2002; FDA, 2007; Gonzalez, 2014) y se dificulta muchas veces debido a la disposición de reactivos principalmente para el serotipificado que en la mayoría de los casos solo están disponibles en laboratorios de referencia (Caffer *et al.*, 2008).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta analítica de gran sensibilidad muchas veces más alta que las propias pruebas “Gold Estándar”, por lo que su uso esta camino a sustituir en algunos casos a los métodos de detección clásicos como el aislamiento viral o el cultivo bacteriano, especialmente de los agentes infecciosos difíciles o imposibles de cultivar, con una rapidez que es necesaria en el diagnóstico de primera mano de enfermedades en casos de brotes epidémicos o monitoreos de enfermedades en grandes poblaciones (OIE, 2008). Los costos para la detección molecular de *Salmonella* spp. son aun elevados en comparación con los métodos tradicionales, pero se compensa por la alta sensibilidad y especificidad que ofrece la PCR, y los beneficios al sector salud al lograr un diagnóstico rápido y preciso (Gonzalez, 2014). Citando un ejemplo el precio aproximado de un análisis de PCR en un laboratorio de diagnóstico en Lima puede rondar los S/. 90.00 por muestra, el cual incluye el precio costo de materiales y reactivos por S/. 40.00 (Extracción de ADN por S/. 17.20, PCR por S/. 18.90 y electroforesis por S/. 3.90), el pago del operario y un margen de ganancia (R. Hurtado, Lima, Comunicación personal), mientras que el diagnostico microbiológico de *Salmonella* spp. siguiendo los pasos del estándar de referencia, puede estar rondando los S/. 40.00, con un costo adicional de S/. 25.00 si se desea realizar el antibiograma (J. Siuce, Lima, Comunicación personal); esto muestra una diferencia en costos que cada vez se estrecha más si además se tiene en cuenta que el análisis de PCR de grandes cantidades de muestras a la vez podría reducir aún más los costos.

Es crucial contar con un método de detección de *Salmonella* que sea práctico y consuma menos tiempo para poder tomar medidas de control más rápidas, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de detección de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis de la PCR Múltiple a partir de muestras sometidas a pre-enriquecimiento no selectivo y hallar la concordancia entre esta y el método convencional de análisis microbiológico para detectar *Salmonella* spp.

Los resultados obtenidos muestran que es posible detectar con éxito *Salmonella* Typhimurium mediante PCR múltiple a partir de muestras de hígado de cuyes en pre-enriquecimiento, lográndose detectarla en 54% (60/111) de animales mientras que mediante la microbiología convencional se logró detectar *Salmonella* spp. tan solo en 41% (45/111) de animales, es decir el PCR múltiple detecto el patógeno en un 25% más de muestras que la microbiología convencional. Por otro lado la concordancia hallada

entre ambos métodos fue substancial ($K=0.64$), sin embargo los resultados de las pruebas son estadísticamente diferentes entre sí, lo que significa que no pueden utilizarse indiferentemente para detectar *Salmonella* spp. debido a que una tiene mayor sensibilidad que la otra.

Uno de los motivos del mayor porcentaje de detección de *Salmonella* spp. mediante la PCR múltiple, es debido a que se realizó después del Pre-Enriquecimiento no selectivo, el cual es necesario para reactivar la *Salmonella* que contenga la muestra y fue de suma importancia en otros estudios (Eriksson y Aspan, 2007; Kumar *et al.*, 2007; Matias *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Mainar-Jaime *et al.* 2013), mas no crucial ya que algunos autores refieren a la etapa de enriquecimiento selectivo mediante MSR/V (Medio Rappaport Vassiliadis Semi-Solido) o Caldo Tetraciónato, como la adecuada para detectar *Salmonella* spp. mediante PCR, ya que presenta mayor porcentaje de detección (Ferraz-Castagna *et al.*, 2005; Mynt *et al.*, 2006; Eriksson y Aspan., 2007; Soria *et al.*, 2011) principalmente porque diluye las sustancias inhibidoras de la PCR y reduce la carga bacteriana competitiva en la muestra, pero significa un día más de demora en obtener el resultado; estas diferencias de detección mediante PCR en las diferentes etapas no estarían ligado a los métodos de extracción de ADN, ya que se usan métodos desde ebullición-centrifugación hasta métodos comerciales sin ninguna diferencia importante. En cuanto a la detección mediante PCR directa de muestras sin pre-enriquecimiento las evidencias son un tanto contradictorias y no muy alentadoras, principalmente debido a las bajas cargas y a la presencia de inhibidores (Ocepek *et al.*, 2006; Matias *et al.*, 2010; Marathe *et al.*, 2012).

En cuanto al desempeño y concordancia de la PCR en muestras de pre-enriquecimiento respecto al análisis microbiológico convencional, se obtienen sensibilidades que varían desde 85% al 98% y una concordancia substancial con índice de kappa de aproximadamente 0.76 (Feder *et al.*, 2001; Ferraz-castagna *et al.*, 2005; Mynt *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007) lo que coincide con el rango hallado en este estudio, por otro lado el límite de diagnóstico en muestras artificialmente contaminadas es muy variable siendo como mínimo 2 UFC/ml hasta 10^3 UFC/ml como máximo de acuerdo al protocolo de PCR (Ocepek *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Kanki *et al.*, 2012; González *et al.*, 2014), llegando en algunos casos a poder detectar solo mediante PCR a *Salmonella* (Ahmadi *et al.*, 2010), estas variaciones dependen mucho de la matriz ya que algunas

contienen más inhibidores de la DNA polimerasa que otras tales como: sales biliares, bilirrubina, hemoglobina o derivados, compuestos polifenólicos, proteinasas, polisacáridos complejos y grasa, que también interfieren en la unión de la enzima con el cloruro de magnesio o que desnaturalizan el DNA (Gonzalez *et al.*, 2014), pero finalmente todos concuerdan en que el método molecular tiene mejor desempeño que el análisis microbiológico convencional para la detección de *Salmonella* spp.

Una importante ventaja del protocolo de PCR utilizado en este estudio es que amplifica secuencia blanco del gen *InvA*, el cual ha sido ampliamente utilizado en este tipo de estudios (Ferraz-castagna *et al.*, 2005; Eriksson y Aspan, 2007; Kumar *et al.*, 2007; Ahmadi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Soria *et al.*, 2011) y también está validado como estándar para la detección molecular de *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2003; WHO, 2010), cabe destacar este aspecto ya que existe 1 muestra que fue positiva al diagnóstico microbiológico y no al molecular, esto puede deberse principalmente a errores en el pipeteo o efecto de algún inhibidor de la PCR, para evitar estos falsos negativos y tener un mejor control de calidad del protocolo de PCR, se recomienda el uso de controles de amplificación interno, los cuales son unos oligonucleótidos sintéticos que tienen la misma secuencia de unión a los cebadores que la PCR diana pero dan un producto de diferente peso molecular (Ferraz-castagna *et al.*, 2005; OIE, 2008; Zhang *et al.*, 2011).

No está de más mencionar que los grados de concordancia de Kappa son totalmente arbitrarios y dependen de la fuente de donde se obtengan para asignarle un nombre (Feder *et al.*, 2001), pero en el actual estudio se utiliza una tabla de grado de concordancia utilizada con anterioridad en estudios con propósito similar (Landis y Koch, 1977; Gonzales y Falcon, 1999).

Por otra parte es necesario esclarecer el motivo por el cual el análisis microbiológico convencional habría detectado menos *Salmonella* spp., lo que se debería principalmente a la viabilidad de las bacterias, la recolección, el transporte o la cantidad de muestra (García, 2011), ya que este método necesita bacterias viables, al contrario de la PCR que solo requiere la existencia de ADN de estas para poder detectar su presencia (Pérez, 2008). Pero es importante también tener en cuenta el tiempo y la temperatura de incubación de cada una de las etapas de la metodología convencional, siendo el enriquecimiento selectivo la más crítica debido a que al extender el tiempo de esta a 5 o

7 días en incubación a temperatura ambiente, aumentaría la posibilidad de detectar *Salmonella* spp., como se ha visto en otro estudio (S. Morales, datos no publicados).

Como observación importante se tiene que el diagnóstico presuntivo en campo no coincide con la detección microbiológica ni la PCR, lo cual nos lleva a señalar un punto muy discutible y que necesita investigación con aun más ahínco, el cual es el cuadro patológico *sui generis* que puede presentar los cuyes con salmonelosis, ya que se ha visto que se puede aislar *Salmonella* spp. de diversos órganos (Matsuura, 2008), pero este estudio escogió solo el hígado como órgano de referencia, lo cual podría haber asolapado la presencia de la bacteria en otros órganos no tomados en cuenta, por otro lado y aún más discutible es si la presencia de *Salmonella* spp. en el hígado puede haber estado relacionado a enfermedad o haberse debido a una migración post-mortem de la bacteria, que puede darse después de 6 horas post-mortem (A. Manchego, Lima, Comunicación personal) desde los intestinos, donde a su vez aun no está muy dilucidado el papel que desempeñan, convirtiendo a los cuyes en portadores sin signos clínicos (Chero, 2015) que desencadenarían la enfermedad por efecto del estrés o si solo son habitantes de la flora normal; estos puntos mencionados no son tomados en cuenta como objetivo del presente estudio que se enfoca más al método de diagnóstico pero vale la pena y merecen ser ampliados por futuros estudios (S. Morales, Lima, Comunicación personal).

Finalmente se presenta al método de PCR múltiple a partir de muestras de pre-enriquecimiento como una poderosa herramienta para la detección rápida de *Salmonella* Typhimurium en cobayos con salmonelosis, basándonos en el poco tiempo que necesita para su detección (2 días) y la practicidad para trabajar grandes cantidades de muestras simultáneamente, además de ser una ventaja el obtener el serotipo, ya que debido a que se trata de una bacteria con antígeno flagelar que puede ser bifásico, el resultado de la serotipificación en el método convencional puede demorar hasta 1 semana y muchas veces solo la realizan laboratorio de referencia. Todo apunta a que este método molecular de detección rápida de *Salmonella* Typhimurium puede ser adoptado como prueba tamiz o como protocolo base para futuros estudios epidemiológicos en todo el país, los que requieren resultado rápidos y confiables. Se hace por último la firme recomendación de no dejar de utilizar ambas técnicas en combinación para mejorar los resultados de detección.

VI. CONCLUSIONES

1. El presente protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple permite detectar a *Salmonella* Typhimurium en 2 días, a partir de muestras en pre-enriquecimiento no selectivo, tomadas de cobayos muertos con diagnóstico presuntivo de salmonelosis.
2. La concordancia entre la PCR múltiple a partir de muestras en pre-enriquecimiento y el análisis microbiológico convencional para la detección de *Salmonella* spp. en casos de salmonelosis en cobayos, es substancial ($K=0.64$), pero los resultados de ambas pruebas son estadísticamente diferentes.

VII. RECOMENDACIONES

1. Validar el protocolo de PCR múltiple para la detección de *Salmonella* Typhimurium en 2 días, a partir de muestras en pre-enriquecimiento, mediante un análisis de sensibilidad y especificidad diagnóstica.
2. Evaluar la concordancia y capacidad de detección de *Salmonella* Typhimurium mediante PCR múltiple directamente de muestras sin pre-enriquecimiento y después del enriquecimiento selectivo, comparándolas con el análisis microbiológico convencional, para así determinar la etapa en la que se obtiene mejores resultados en su detección.
3. Determinar mediante un estudio epidemiológico con mayor tamaño de muestra, si *Salmonella* Typhimurium es la única serovariedad presente en cuyes en el Perú, y de esta manera estandarizar un protocolo de PCR específico solo para esa serovariedad.

VIII. LITERATURA CITADA

1. [CFSPH] The Center for Food Security & Public Health. 2005. Salmonellosis [Internet], [04 de Mayo del 2016]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal_salmonellosis.pdf
2. [EFSA] European Food Safety Authority. 2009. Report on the availability of molecular typing methods for *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* isolates from food, animals and feedingstuffs in European Union Member States (and in some other reporting countries). The EFSA Journal. 272: 1-52.
3. [FDA] Food and Drug Administration. 2007. Bacteriological Analytical Manual: Salmonella. 8° ed. United States. 14 p.
4. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. [Internet], [24 de Marzo 2015]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/Cenagro/redatam/#>
5. [ISO] International Organization for Standardization. 2002. ISO 6579:2002 (E) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4° ed. Switzerland. 27 p.
6. [MINAG] Ministerio de Agricultura y riego. 2008. Situación actual del Cuy. [Internet], [24 de Marzo 2015]. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/300-cuyes>

7. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2008. 6° Ed. Francia: Office International des Epizooties.
8. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2010. Salmonellosis. En: Manual of diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6° Ed. Francia: Office International des Epizooties.
9. [WHO] World Health Organization. 2010. Diagnóstico de *Vibrio cholera* y *Salmonella* spp. por PCR, Inversión de fase en *Salmonella* spp. Argentina: III Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO-GFN). 54p.
10. Ahmadi M, Dalirneghaddeh B, Aski H, Khoshbakht R. 2010 Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and conventional cultivation methods for detection of carriers of *Salmonella* spp. in cattle and buffalo. Comp Clin Pathol (2010) 19:251-255.
11. Aliaga L. 1995. Crianza de cuyes. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Dirección General de Transferencia de Tecnología. Programa de Investigación en Crianzas Familiares. Lima – Perú: 170 p.
12. Ameghino C. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*). Extr IVITA (3): 260-261.
13. Bartholomew M, Heffernan R, Wright J, Klos R, Monson T, Khan S, Trees E, Sabol A, Willems R, Flynn R, Deasy M, Jones B, Davis J. 2014. Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Infection Associated with Pet Guinea Pigs. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. June 2014, 14(6): 414-421.
14. Blackburn C. 1993. Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in foods. J. Appl. Bacteriol. 75: 199-214.
15. Brodsky E, Ghorri N, Falkow S, Monack D. 2005. Mig-14 is an inner membrane-associated protein that promotes *Salmonella* Typhimurium resistance to CRAMP,

survival within activated macrophages and persistent infection. *Molecular Microbiology* 3: 954-972.

16. Caffer M, Terragno R, Binsztein N. 2008. Manual de Procedimientos Diagnostico y Caracterizacion de *Salmonella* spp. Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 76 p.
17. Canchari A. 1995. El cuy, Manual práctico para su crianza en la comunidad. Ministerio de Agricultura. PRONAMACHCS. 180 p.
18. Chauca L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. [Internet], [24 de Marzo 2015]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s00.htm>
19. Chauca L. 2007. Realidad y perspectiva de la crianza de cuyes en los países andinos. En: XX Reunión ALPA. Cusco: Asociación Latinoamericana de Producción Animal.
20. Chirinos O, Muro K, Concha W, Otiniano J, Quezada JC, Rios V. 2008. Crianza y comercialización de cuy para el mercado limeño. Lima: Universidad ESAN. 192p.
21. Clavijo R, Loui C, Andersen G, Riley L, Lu S. 2006. Identification of Genes Associated with Survival of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. *Applied and Environmental Microbiology*. Feb 2006, p 1055-1064.
22. Eriksson E, Aspan A. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet Res*. 2007 Sep 22; 3: 21.
23. Feder I, Nietfeld J, Galland J, Yeary T, Sargeant J, Oberst R, Tamplin M, Luchansky J. 2001. Comparison of Cultivation and PCR-Hybridization for Detection of *Salmonella* in Porcine Fecal and Water Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. July 2001, p. 2477–2484.
24. Feldsine P, Lienau A, Leung S, Mui L, Humbert F, Bohnert M, Mooijman K, Schulten S, Veld P, Rollier P, Leuschner R, Capps K. 2003. Detection of

- Salmonella in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 Salmonella culture procedure and the AOAC official method: collaborative study. J AOAC Int. 2003 Mar-Apr; 86(2): 275-295.
25. Ferraz-Castagna S, Muller M, Macagna M, Rodenbusch C, Canal C, Cardoso M. 2005. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. Brazilian Journal of Microbiology (2005) 36:373-377.
 26. Figueroa M, Verdugo A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. Rev Latinoam Microbiol 47 (1-2): 25-42.
 27. Fournier J, Knox K, Harris M, Newstein M. 2015. Family Outbreaks of Nontyphoidal Salmonellosis following a Meal of Guinea Pigs. Case Reports in Infectious Diseases. Vol. 2015, Article ID 864640, 3 p.
 28. Fox J, Cohen B, Loew F. 1984. Laboratory Animal Medicine. 1° Ed. Orlando: Academic Press. 766 p.
 29. García C. 2011. Salmonelosis Porcina en España: Prevalencia, factores de riesgo y Resistencia antimicrobiana. Tesis doctoral. León: Universidad de León. 197 p.
 30. Garmendia M, Selgrad S, Alezones F. 2000. Salmonelosis en animales de laboratorio. [Internet], [24 de Mayo del 2016]. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd68/texto/mgarmentia.htm
 31. Gil V. 2007. Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. En: XX Reunion ALPA. Cusco: Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal.
 32. González A, Falcón N. 1999. Análisis de datos en Medicina Veterinaria. Pub. Tec. FMV, Lima N° 49: 57-58.
 33. Gonzalez J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. 2014. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte Barranquilla 2014; 30 (1): 73-94.
 34. Herráez A, Luque J. 2012. Biología molecular e ingeniería genética. 2° Ed. Barcelona: Elsevier. 512 p.

35. Jamshidi A, Kalidari G, Hedayati M. 2009. Isolation and identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from the eggs of retail stores in Mashhad, Iran using conventional culture methods and multiplex PCR assay. *Journal of Food Safety* 30 (2010) 558-568.
36. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. 2004. *Diagnostico Microbiológico – Texto y Atlas color*. 5° ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1432 p.
37. Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravortty D. 2010. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes and Infection* 12: 809-818.
38. Landis J, Koch G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977 Mar; 33(1): 159-74.
39. Layme A. 2009. Frecuencia de lesiones anatomopatológicas en cobayos con diagnostico bacteriológico de *Salmonella* sp. Remitidos al laboratorio de histología, embriología y patología veterinaria de la FMV-UNMSM durante el periodo 2001-2007. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 66 p.
40. Leung K, Finiay B. 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci* 88: 11470-11474.
41. Mainar-Jaime RC, Andres J, San Roman B, Garrido V, Grilló M. 2013. Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Standard Method for detection of *Salmonella* spp. on Mesenteric Lymph Nodes from slaughter pigs. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan; 51(1): 89–94.
42. Malorny B, Bunge C, Helmuth R. 2007. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods* 70 (2007) 245-251.
43. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. 2003. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology*. Jan 2003, p 290-296.

44. Marathe S, Chowdhury R, Bhattacharya R, Govindasamy A. et al. Chakravortty. 2012. Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against *hlyA* gene. *Food Control*. 2012; (23): 559-563.
45. Marcelo G. 2015. Identificación de *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium aislada de cuyes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 51 p.
46. Matias BG, Pinto P, Cossi M, Silva A, Vanetti M, Nero L. 2010. Evaluation of polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poultry Science* 89 :1524–1529
47. Matsuura A. 2008. Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella* entérica aislada de cobayos de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Anchash. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 65 p.
48. Mattos J. 2007. Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) como aditivo no nutricional en la estimulación de *Lactobacillus* sp., y control de *Salmonella* Typhimurium en cuyes de carne. Tesis para optar el grado de Magister. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 77 p.
49. Myint M, Johnson Y, Tablante N, Heckert R. 2006. The effect of the pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology* 23 (2006) 599–604.
50. Ocepek M, Pate M, Micunovic J, Bole-Hribovsek V. 2006 Comparison and optimization of two PCR tests for identification of *Salmonella* in poultry feed-stuffs, liver and faeces. *Slov Vet Res* 2006; 43 (1): 61-66.
51. Ordoñez R. 2003. Plan de introducción de la carne de cuy en Lima metropolitana: Estudio de mercado y propuesta empresarial. Tesis de Magister en Administración de Negocios. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. 213 p.

52. Orson N. 1972. The guinea pig. Departamento de Agricultura. National Agricultural Library USA. 73 p.
53. Parra M, Durango J, Mattar S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Rev MVZ Cordoba 7: 187-200.
54. Pathmanathan S, Cardona-Castro N, Sanchez-Jimenez M, Correa-Ochoa M, Puthuchery S, Thong K. 2003. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hlyA* gene. Journal of Medical Microbiology (2003), 52, 773-776.
55. Perez C, Sanchez M, Henao S, Cardona-Castro N. 2008. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en huevos. Arch Med Vet 40, 235-242.
56. Rabsch W, Andrews H, Kingsley R, Prager R, Tschape H, Adams L, Braumler A. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. Infect. Immun. 70: 2249-2255.
57. Rahn K, De Grandis S, Clarke R, McEwen A, Galan J, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles C. 1992. Amplification of an *InvA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Molecular and Cellular Probes (1992) 6, 271-279.
58. Ramírez A. 1972. Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 48 p.
59. Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3° Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
60. Sánchez M, Cardona N. 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociacion Colombiana de Infectologia, Infectio 7 (1): 22 – 29.
61. Servicio Nacional de Sanidad Agraria [SENASA]. 2014. Procedimiento: Recolección y envío de especímenes/muestras, y exámenes solicitados al

laboratorio. [Internet], [18 de Junio 2015]. Disponible en:
<http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/PRO-UCDSA-06-Recoleccion-y-envio-de-especimenes.pdf>

62. Simeone D, Aramburu H. 1967. Enzootia de cobayos (*Cavia cobaya*) debido a *Salmonella* Typhimurium. Rev Med B. Aires 48: 113-122.
63. Soria MC, Soria MA, Bueno D. 2012. Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. Poultry Science 91: 616-626.
64. Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Colin P. 1999. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Letters in Applied Microbiology 1999, 29, 1-6.
65. Thermo Fisher Scientific. 2014. Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit – User guide. [Internet], [22 de Abril 2016]. Disponible en:
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012663_GeneJET_Genomic_DNA_Purification_UG.pdf
66. Zhang G, Brown E, Gonzalez-Escalona N. 2011. Comparison of Real-Time PCR, Reverse Transcriptase Real-Time PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. Applied and Environmental Microbiology, Sept. 2011, p. 6495–6501